

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**Procjena mikrobiološke stabilnosti kobasica od mesa divlje svinje
proizvedenih primjenom autohtonog soja *Lactobacillus curvatus***

DIPLOMSKI RAD

Petra Špoljarić

Zagreb, rujan, 2017.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET

Diplomski studij:
Agroekologija: Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi

**Procjena mikrobiološke stabilnosti kobasica od mesa divlje svinje
proizvedenih primjenom autohtonog soja *Lactobacillus curvatus***

DIPLOMSKI RAD

Petra Špoljarić

Mentor: izv. prof. dr. sc. Mirna Mrkonjić Fuka

Neposredni voditelj: Irina Tanuwidjaja, mag. ing. agr.

Zagreb, rujan, 2017.

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

**IZJAVA STUDENTA
O AKADEMSKOJ ČESTITOSTI**

Ja, **Petra Špoljarić**, JMBAG 0178093839, rođen/a 03.06.1993. u Varaždinu, izjavljujem da sam samostalno izradila/izradio diplomski rad pod naslovom:

**Procjena mikrobiološke stabilnosti kobasica od mesa divlje svinje
proizvedenih primjenom autohtonog soja *Lactobacillus curvatus***

Svojim potpisom jamčim:

- da sam jedina autorica/jedini autor ovoga diplomskog rada;
- da su svi korišteni izvori literature, kako objavljeni tako i neobjavljeni, adekvatno citirani ili parafrazirani, te popisani u literaturi na kraju rada;
- da ovaj diplomski rad ne sadrži dijelove radova predanih na Agronomskom fakultetu ili drugim ustanovama visokog obrazovanja radi završetka sveučilišnog ili stručnog studija;
- da je elektronička verzija ovoga diplomskog rada identična tiskanoj koju je odobrio mentor;
- da sam upoznata/upoznat s odredbama Etičkog kodeksa Sveučilišta u Zagrebu (Čl. 19).

U Zagrebu, dana _____

Potpis studenta / studentice

**SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
AGRONOMSKI FAKULTET**

IZVJEŠĆE

O OCJENI I OBRANI DIPLOMSKOG RADA

Diplomski rad studenta/ice **Petre Špoljarić**, JMBAG 0178093839, naslova

**Procjena mikrobiološke stabilnosti kobasica od mesa divlje svinje
proizvedenih primjenom autohtonog soja *Lactobacillus curvatus***

obranjen je i ocijenjen ocjenom _____, dana _____.

Povjerenstvo:

potpisi:

1. Mentor:	Izv.prof.dr.sc. Mirna Mrkonjić Fuka
Neposredni voditelj:	Irina Tanuwidjaja, mag. ing. agr.
2. Član povjerenstva:	Izv.prof.dr.sc. Danijel Karolyi
3. Član povjerenstva:	Doc.dr.sc. Ivica Kos

Zahvala

Ovime zahvaljujem mentorici izv. prof. dr. sc. Mirni Mrkonjić Fuka na pruženoj prilici rada u laboratoriju te na ukazanom povjerenju i izdvojenom vremenu.

Hvala Irini Tanuwidjaja, mag. ing. agr. na pomoći oko koncipiranja ovog rada, njegove izrade i pisanja te pomoći tijekom istraživanja.

Veliko hvala Ani Žgomba Maksimović, mag. ing. agr. na korisnim savjetima i pomoći u svim fazama istraživanja, velikom strpljenju, predanosti radu i brzim odgovorima na sva pitanja i nedoumice.

Hvala dr. sc. Nataši Hulak i ostalim djelatnicama laboratorija na Zavodu za mikrobiologiju na pomoći, savjetima i iskustvima koja nam je prenijela.

Zahvaljujemo se i Hrvatskoj zakladi za znanost koja je omogućila sredstva za ovo istraživanje u sklopu projekta "Očuvanje mikrobne raznolikosti povezane s proizvodnjom tradicionalnih hrvatskih kobasica od mesa divljači: biotehnološka i sigurnosna karakterizacija" (miCROgame UIP-11-2013-6640).

Sadržaj

1.	UVOD	1
1.1	Cilj istraživanja.....	2
2.	PREGLED LITERATURE	3
2.1.	Opis pripreme mesa divljači i procesa proizvodnje trajnih kobasica	3
2.2.	Bakterije mliječne kiseline	8
2.1.1	Rod <i>Lactobacillus</i> s naglaskom na vrstu <i>Lactobacillus curvatus</i>	9
3.	MATERIJALI I METODE.....	11
3.1	Priprema korištenih otopina	11
3.1.1	Peptonska voda (0,1 %).....	11
3.1.2	Fiziološka otopina (0,85 %)	11
3.1.3	Otopina obranog mlijeka (10 %)	11
3.2	Priprema selektivnih mikrobioloških podloga.....	11
3.2.1	MRS tekuća selektivna podloga (De Man, Rogosa and Sharpe Broth.).....	11
3.2.2	MRS kruta selektivna podloga (De Man, Rogosa and Sharpe Agar)	11
3.2.3	LamVab kruta selektivna podloga.....	11
3.2.4	KAA kruta selektivna podloga (Kanamycin Aesculin Azide Agar)	12
3.2.5	VRBG kruta selektivna podloga (Violet Red Bile Glucose Agar)	12
3.2.6	CCA kruta selektivna podloga (Chromogenic Coliform Agar).....	12
3.2.7	DRBC kruta selektivna podloga (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar)	12
3.2.8	BP kruta selektivna podloga (Baird Parker Agar)	12
3.3	Uzgoj biomase soja <i>Lb. curvatus</i> MRS_532	13
3.4	Uzorkovanje	13
3.5	Određivanje pH vrijednosti i aktiviteta vode (a_w)	15
3.6	Izolacija laktobacila, određivanje CFU vrijednosti i pročišćavanje	15
3.7	Mikrobiološka analiza uzoraka kobasica.....	16
3.8	Izolacija DNA.....	16
3.9	Određivanje sposobnosti preživljavanja rep-PCR metodom.....	17
4.	REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1	Fizikalna svojstva kobasica	19
4.2	Prikupljanje izolata laktobacila i određivanje njihove CFU vrijednosti.....	21
4.3	Mikrobiološka analiza	23
4.4	Analiza rep-PCR obrazaca	27
5.	ZAKLJUČCI	33

6.	LITERATURA.....	34
7.	ŽIVOTOPIS	39

Sažetak

Diplomskog rada studenta/ice **Petre Špoljarić**, naslova

Procjena mikrobiološke stabilnosti kobasica od mesa divlje svinje proizvedenih primjenom autohtonog soja *Lactobacillus curvatus*

Cilj ovog rada je utvrditi mikrobiološku stabilnost tradicionalno fermentiranih trajnih kobasica od mješavine mesa domaće i divlje svinje. U mesnu smjesu inokuliran je soj *Lactobacillus curvatus* MRS_532 koji je prethodno pokazao dobar tehnološki potencijal i selektiran je za primjenu kao starter kultura. Tijekom fermentacije i zrenja kobasica je praćeno preživljavanje inokuliranog soja, kao i njegov utjecaj na mikrobiološki sastav kobasica, u odnosu na neinokuliranu kontrolu. Mjerenjem pH vrijednosti utvrđena je značajna razlika pada pH vrijednosti kod inokulirane kobasice nakon 7. ($p < 0,001$) i 40. dana ($p < 0,05$) u odnosu na neinokuliranu kobasicu. Broj laktobacila je u inokuliranoj kobasici bio značajno veći od broja laktobacila u kontrolnoj kobasici tijekom svih faza ($p < 0,05$), dok je broj neželjene mikrobiote generalno padao prema kraju zrenja. Temeljem analize obrazaca metode otiska prsta (rep-PCR) vidljivo je da dodana starter kultura preživljava, no ima tek ograničen utjecaj na proliferaciju prirodno prisutne mikrobiote.

Ključne riječi: tradicionalne trajne kobasice, *Lactobacillus curvatus*, mikrobiološka stabilnost, rep-PCR

Summary

Of the master's thesis – student **Petre Špoljarić**, entitled

Estimation of microbiological stability of wild boar meat sausages produced by the use of indigenous strain *Lactobacillus curvatus*

The aim of this study is to establish the microbiological stability of traditionally fermented permanent sausages of domestic pig and wild boar meat mixtures. A sausage production mixture was inoculated with the strain *Lactobacillus curvatus* MRS_532 which has shown a good technological potential in the previous studies and is selected for use as a starter culture. During fermentation and ripening the sausage was followed by survival of the inoculated strain, as well as its influence on the microbiological composition of sausages, compared to the uninoculated control. The pH value was determined by a significant difference in the pH value of the inoculated sausage after 7. ($p < 0,001$) and 40 days ($p < 0,05$) compared to uninoculated sausage. The number of lactobacilli in inoculated sausage was significantly higher than the number of lactobacilli in the control sausage during all phases ($p < 0,05$), while the number of unwanted microbial generally fell towards the end of ripening. Based on the analysis of fingerprinting patterns (rep-PCR) it is apparent that the starter cultures survive, but have only limited influence on the proliferation of the naturally occurring microbial.

Keywords: Traditional dry sausages, *Lactobacillus curvatus*, microbial stability, rep-PCR

1. UVOD

Tradicionalne trajne kobasice od mesa divljači se proizvode od mješavine mesa divljih i domaćih životinja. Najčešće se koristi meso domaće svinje (*Sus scrofa domestica*) pomiješano sa mesom divlje svinje (*Sus scrofa*) ili jelena (*Cervus elaphus*). Kobasice se proizvode na malim obiteljsko-poljoprivrednim gospodarstvima prema vlastitoj recepturi koja se često nasljeđuje s koljena na koljeno te se smatra izuzetno vrijednom ostavštinom predaka. Takvim načinom proizvodnje dobivaju se autentični proizvodi, bez dodatka starter kultura ili aditiva, sa prepoznatljivim organoleptičkim svojstvima koji su danas kod potrošača sve više cijenjeni. Meso divljači posljednjih je godina sve više traženo i cijenjeno zbog svog karakterističnog jakog okusa, male količine masti, velike količine proteina te dobrog omjera između nezasićenih i zasićenih masnih kiselina. Međutim, opisani način proizvodnje spontano fermentiranih kobasica od mješavine mesa divljih i domaćih životinja je nestandardiziran, čime se često može dobiti proizvod neujednačene kvalitete i upitne mikrobiološke ispravnosti (Trichopoulou i sur., 2007; Markov i sur., 2013). Povećan mikrobiološki rizik naročito je vezan uz način odstrjela divljači i obrade mesa, zbog čega patogeni mikrobiota može lako kontaminirati sirovinu i dospjeti u kobasice. Kako bi se proizvodnja standardizirala, mogu se koristiti starter kulture koje prethodno moraju proći čitav niz tehnoloških i sigurnosnih karakterizacija. Kao starteri najčešće se upotrebljavaju bakterije mliječne kiseline (BMK) koje dominiraju u procesu fermentacije te imaju dugu i sigurnu povijest upotrebe i aplikacije u fermentiranim proizvodima (Caplice i Fitzgerald, 1999; Ray, 1992; Wood, 1997; Wood i Holzapfel, 1995). BMK osiguravaju ne samo mikrobiološku kakvoću i stabilnost konačnog proizvoda, već svojim metabolizmom često pozitivno utječu na organoleptička svojstva krajnjeg proizvoda (Cenci – Goga i sur., 2012; Frece i sur., 2014).

1.1 Cilj istraživanja

Na tržištu postoje komercijalne starter kulture, međutim, zbog njihove nejednake uspješnosti u svim tipovima kobasica sve više se istražuju novi, autohtoni sojevi koji bi se mogli koristiti kao potencijalni starteri. Upravo se tradicionalni proizvodi, u koje pripadaju i trajne kobasice od mesa divljači, smatraju potencijalnom riznicom takvih mikroorganizama, među kojima je od posebnog značaja rod *Lactobacillus*.

Soj *Lactobacillus curvatus* MRS_532 je izoliran iz ovakvih kobasica te je u prethodnim istraživanjima pokazao dobar tehnološki potencijal i selektiran je za primjenu kao starter kultura u njihovoj daljnjoj proizvodnji. Hipoteza ovog istraživanja je da će nakon inokulacije soja *Lb. curvatus* MRS_532 u mesnu smjesu za proizvodnju kobasica, soj pokazati dobru kompetitivnost sa prirodno prisutnom mikrobiotom, što će na kraju rezultirati mikrobiološki stabilnim gotovim proizvodom.

Specifični ciljevi ovog istraživanja su:

1. Umnažanje biomase soja *Lactobacillus curvatus* MRS_532 i inokulacija navedenog soja u mesnu smjesu za proizvodnju kobasica
2. Utvrditi utjecaj inokuliranog soja na pH i aktivitet vode u inokuliranim kobasicama u odnosu na neinokuliranu kontrolu
3. Utvrditi sposobnost preživljavanja inokuliranog soja tijekom fermentacije i zrenja kobasica
4. Utvrditi sposobnost inokuliranog soja da inhibira rast i razmnožavanje bakterija kvarenja i oportunističkih patogena

2. PREGLED LITERATURE

2.1. Opis pripreme mesa divljači i procesa proizvodnje trajnih kobasica

Od antike do danas, čovjek je tražio metode očuvanja i produljenja roka trajanja svoje hrane. Najstarija metoda očuvanja je soljenje o kojoj piše i Homer 830. godine u svom kulturnom djelu Odiseja. Od svih mesnih prerađevina, kobasica je najprivlačnija i široko upotrebljavana. Engleski naziv *sausage* potječe od latinske riječi *salsus*, što znači slano, stoga je kobasica bilo koje slano, mljeveno meso. U svijetu postoje različite vrste kobasica, a svaka je regija razvila svoj osebujni stil pripreme te su one pod utjecajem dostupnosti lokalnih sastojaka i začina, stoga ni Hrvatska obiteljska poljoprivredna gospodarstva nisu iznimka. Klima je također važan čimbenik za razvoj specifičnih svježih i trajnih kobasica. Regije s različitim godišnjim dobima koristile su različite tehnike za očuvanje mesa. U hladnijim dijelovima prevladavaju svježije kobasice koje su u kratkom vremenu ohlađene, dok se sušenje razvilo tijekom toplijih perioda pošto trajna kobasica ne zahtijeva nikakvo hlađenje. Kobasice se proizvode u određenim dijelovima svijeta te su specifične na nacionalnoj, pa čak i na regionalnoj razini. One se mogu napraviti s gotovo bilo kojom vrstom mesa, uključujući i mješavine različitog mesa (Mohan, 2004), iako se u većini recepata koristi svinjetina i govedina. Meso divljači (jelen, divlja svinja, divlje ptice, medvjed) može biti zamijenjeno za svinjetinu ili govedinu te na taj način doprinijeti jedinstvenom i originalnom okusu. Vrlo je važno da se poslije odstrela životinje, s mesom pravilno rukuje i provede što hitnija obradba, poglavito krupne divljači, zbog očuvanja mesa, posebice u ljetnim mjesecima. Najvažnije mjere uključuju evisceraciju i što brže hlađenje trupla. Stoga se spomenutoj obradi divljači pristupa odmah na mjestu odstrela ili na najbližem prikladnom mjestu. Pored toga, neophodno je navesti da je na mjestu odstrela zabranjeno skidanje kože i rasijecanje trupova (Živković, 1982.). Trupove divljači potrebno je otvoriti cijelom dužinom i izvaditi unutrašnje organe. Naime, otvaranje trupla osim uklanjanja probavnih organa bogatih bakterijama i enzimima, ima ulogu pospješivanja hlađenja divljači. Pri tom postupku valja paziti da sadržaj, prvenstveno probavnog sustava, ne kontaminira meso pa je u tu svrhu dobro podvezati jednjak i završno crijevo. U muških životinja, a posebice u veprova, naglasak se stavlja na što hitnije uklanjanje spolnih organa (Darabuš i Jakelić, 1996.), a kod jazavca i podrepne mirisne žlijezde. Ovaj čin nužan je kako divljač ne bi poprimila neugodan miris sekreta navedenih žlijezda. Nakon evisceracije, sljedeća briga ali i dužnost lovca i posjednika divljačine je dopremiti trupove do objekta odobrenog za hlađenje, gdje se ohlade na + 7 °C (Živković, 1982). Djelovanjem enzima razgrađuju se bjelančevine koje pomažu u stvaranju okusa. „Crveno meso“ stoga treba sazrijevati nekoliko dana na temperaturi

hladnjaka (najmanje 3 dana kod mladih životinja, odnosno 5 do 7 dana kod zrelih životinja), kako bi se postigla njegova potpuna finoća vlakana i pun okus. Ako se tako pripremljeno meso dodatno pravilno duboko zamrzne, njegova se kvaliteta očuva nekoliko mjeseci. Meso divlje svinje zbog znatnog udjela masnoće ne smije biti uskladišteno dubokim smrzavanjem duže od 6 mjeseci. Tamna boja mesa divljači često je uzrokovana time što se divljač ne kolje, nego odstreljuje te često slabije iskrvari, pa sadrži veći udio pigmenta i crvenih krvnih zrnaca nego meso domaćih životinja. Krupnu divljač treba objesiti za stražnje noge kako bi pospješili istjecanje krvi. Također, guljenjem je potrebno sa trupova ukloniti kožu, a ukoliko je riječ o vrjednijim krznima (zec, divlji kunić) moguće je skidanje kože svlačenjem (Darabuš i Jakelić, 1996.). Ostatke krvi potrebno je sa trupova ukloniti jednokratnim ubrusima (Andrašić, 1967.). Trupla divljači nužno je dopremiti u objekte za rasijecanje i obradu u naredna 24 sata. U sklopu navedenog postupka provodi se i veterinarsko-sanitarni pregled mesa divljači.

Izrada kobasica je izvrstan način korištenja manje kvalitetnih komada mesa, niže ekonomske vrijednosti, kao što su meso glave, vrata i leđa kao i obrezani, tanki dijelovi mesa uz uvjet da su svjež i čisti. Korišteno meso treba proizaći od zdrave stoke (svinja, krava) ili divljači te ga je potrebno sanitarno ispitati. Meso divljači poput mesa jelena, losa i antilope može sadržavati jako malo masnoća zbog njihovih životnih navika i prirodne prehrane. Nadalje, masnoće iz mesa divljači sadrže visok udio polinezasićenih masnih kiselina. Njihov nutritivni sastav je slična sastavu pilećih prsa bez kože, pri čemu većina odrezaka (80 grama) ima 110 do 130 kalorija, 2 g masnoća i 25 g bjelancevina. Bandik i Ring (1996.) navode da meso divljači, posebice divljih preživača, zečeva i divljih kunića, ima posebnu i specifičnu aromu te predstavlja važnu namirnicu zbog male količine masti i povoljnog sadržaja esencijalnih aminokiselina, nezasićenih masnih kiselina i vitamina. Problemi s mesnim proizvodima, na primjer kobasicama, proizlaze iz toga što se time često unosi previše „skrivenih“ masti. Upravo se u tome nalazi jedna od najvećih prednosti mesa divljači gdje stručnjaci o prehrani savjetuju miješanje mesa divljači zajedno sa govedinom, teletinom, piletinom i puretinom. Uobičajeno je koristiti svinjetinu kao izvor masnoća za kobasice. Kobasica bi trebala imati 15 do 20% sadržaja masti kako bi se postigla poželjna tekstura i okus. Različite mješavine mesa i postotak masnoća utječe na konačni proizvod.

Na Slici 1 prikazana je mesna smjesa sa začинима, prije punjenja u ovitke. U tradicionalnoj, kućnoj proizvodnji prisutno je svega nekoliko dodataka. To su prvenstveno kuhinjska sol, šećeri (najčešće saharoza) i začini. Dodavanje nitrata i nitrita nije uobičajena praksa u tradicionalnoj proizvodnji, ali postaje sve prisutnija. Kuhinjska sol (NaCl) je sastojak koji se uvijek koristi u

proizvodnji kobasica (Pearson i Gillet, 1996). Tehnički, to je jedina ne-mesna supstanca koja je potrebna da se proizvod smatra kobasicom. NaCl ima tri funkcije u mesu, a to su smanjenje količine raspoložive vode (očuvanje i produljenje roka valjanosti), potpomaže ekstrakciju miofibrilarnih proteina mesa koji su potrebni da se proizvod veže za emulziju masnoća kao i poboljšanje okusa (Meat Board, 1991). Također, NaCl ima konzervirajuće djelovanje pa u određenim koncentracijama inhibira razmnožavanje štetnih mikroorganizama. NaCl se dodaje u koncentraciji od 1,6 % do 3% (w/w) ukupne mase kobasice. Osim kuhinjske soli, u industrijskoj, a sve češće i u kućnim pripremama trajnih kobasica koriste se nitratne i nitritne soli koje se dodaju u maloj količini (0,010-0,015 %) u obliku soli za salamurenje (mješavina NaCl-a i nitrita/nitrata). Nitriti imaju ulogu značajnog umanjenja preživljavanja i razmnožavanja anaerobnih bakterija (npr. *Clostridium botulinum*). Osim toga imaju antioksidativno djelovanje, smanjuju aktivitet vode te doprinose razvoju željene boje. Preveliki udjeli nitrita su nepoželjni jer preostali nitriti koji se nisu iskoristili u nadjevu mogu reagirati s proteinima mesa što može dovesti do tvorbe nitrozoamina koji imaju kancerogena svojstva. Šećer se koristi za poboljšanje okusa i za suzbijanje lagane gorčine okusa soli. Najčešće se koriste monosaharidi (glukoza i galaktoza), disaharidi (saharoza i laktoza), a ponekad i polisaharidi (škrob). Šećeri su izvor energije za mikroorganizme, a kao nusproizvod toga nastaju kiseline (najviše mliječna kiselina) koje utječu na pH vrijednost nadjeva. Također, jedan od neizostavnih dodataka su začini o kojima najviše ovisi razlika između različitih trajnih kobasica. Najčešće se koristi bijeli i crni papar, paprika, crveni luk, korijander, mažuran, kim, lovor, ružmarin, peršin, timijan i cimet. Kod upotrebe začina posebni oprez treba posvetiti njihovoj higijenskoj ispravnosti. Ukupni udio začina je 1-3 %, a koriste se radi postizanja karakterističnog okusa, mirisa i boje trajnih kobasica, odnosno senzornih (organoleptičkih) svojstava. Osim toga, začini su antioksidansi, stimulatori aktivnosti bakterija mliječne kiseline te inhibitori nepoželjnih organizama. Mnogi začini imaju farmaceutsko djelovanje. Ostali sastojci koji se dodaju, a uglavnom su zastupljeni u industrijskoj proizvodnji su: askorbinska kiselina, egzogeni proteini, fosfati, pojačivači okusa (glutaminska i gvanilna kiselina) i sredstva za poboljšanje okusa (protein hidrolizati, začinsko bilje i ekstrakti dima) (Mrkonjić Fuka i Kos, 2015).



Slika 1. Mješavina mesa i začina izrađena na poljoprivredno-obiteljskom gospodarstvu u okolini Požege.

Primjeri recepata za pripremu kobasica od mesa različite divljači navedeni su u Tablici 1.

Tablica 1. Primjeri recepata za pripremu kobasica od mesa divljači.

Kobasice od mesa divlje svinje (Hotel Cervo, Švicarska, 2016)		Kobasice od snetine (Miles, J., 2004, New York)	
125 g	mesa divlje svinje	1 kg	snetine
25 g	svježe teleće jetre	500 g	svinjskog buta
30 g	dimljene slanine	500 g	svinjske vratine
30 g	slanine	3 jušne	žlice soli
10 g	soli	1 čajna žlica	granula češnjaka
2	češnja češnjaka	1 čajna žlica	papra
8 dcl	temeljca od povrća	1 čajna žlica	granula luka
1	luk	3 jušne	žlice sušenog đumbira
1	naribana jabuka	½ čajne	žlice svježe mljevenih borovica
10 g	maslinovog ulja	2 dcl	bjelanjaka
Začini: ružmarin, timijan, anis, papar, komorač		1 jušna	žlica kukuruznog škroba
4	prirodna ovitka	svježi prirodni ovici, 10 min močeni u vodi	

Tehnološki proces proizvodnje trajnih kobasica odlikuje specifična priprema sirovina, hladno dimljenje i zrenje s ciljem razvoja specifičnih senzornih (organoleptičkih) svojstava. Priprema sirovine uključuje obradu mesa i masnog tkiva nakon koje slijedi rezanje na trake radi lakšeg usitnjavanja i postizanja zrnate strukture granulata te pothlađivanje ili smrzavanje sirovina. U

ovoj fazi vrši se i priprema začina koji se dodaju u svježem stanju (npr. usitnjavanje češnjaka) kao i priprema starter kultura ukoliko se koriste. Tijekom usitnjavanja temperatura mesa ne bi smjela biti viša od 10 °C jer može uzrokovati mazavost masti i manjkavost čvrstoće kod narezivanja gotovog proizvoda. U tradicionalnoj proizvodnji se najčešće koriste granulacije veće od 5 mm, dok su one u industrijskoj proizvodnji manje od 5 mm. Nakon usitnjavanja mesa i masnog tkiva, dodaju se soli, šećeri, začini, aditivi i starter kulture, te se sve zajedno dobro pomiješa u specijalnim uređajima. Nadjev trajnih kobasica nakon miješanja se kod tradicionalne izrade ostavlja u hladnoj prostoriji na ujednačavanju. Ujednačena se smjesa puni u prirodna ili umjetna crijeva koja moraju biti dovoljno čvrsta, elastična te propusna za dim, zrak i vodu. Ukoliko se koriste prirodna crijeva, ona trebaju biti očišćena od masti koja otežava sušenje i brzo užegne za vrijeme zrenja. Poslije punjenja kobasice se vezuju, vješaju i odnose na fermentaciju, sušenje i zrenje. Fermentacijom se nadjev kobasica iz neprerađenog i mikrobiološki nestabilnog oblika pretvara u postojani proizvod specifične boje, ugodnog okusa i mirisa te mikrobiološki stabilan. Tijekom ove faze kobasice se stavljaju u komore za fermentaciju u kontroliranim uvjetima temperature, relativne vlažnosti i brzine strujanja zraka ovisno o vrsti kobasice koja se proizvodi. Kod proizvodnje tradicionalnih kobasica uvjeti su prirodni i manje kontrolirani, ali uvažavaju potrebne parametre. Temperature tijekom fermentacije mogu biti niske 5-15 °C i one su karakteristične za tradicionalnu proizvodnju ili više od 20-30 °C kao što je prisutno u industrijskim uvjetima proizvodnje radi brže proizvodnje mliječne kiseline, odnosno brže fermentacije, ali i bržeg sušenja i u konačnici vremenski kraće proizvodnje. Relativna vlaga zraka tijekom fermentacije varira od početnih maksimalnih vrijednosti od 86 do 95 % pa do završnih najmanjih vrijednosti od 63 do 75 % što dovodi do pada aktiviteta vode. Kod proizvodnje trajnih kobasica dimljenje se provodi usporedno sa sušenjem i stoga je jedan od ključnih procesa proizvodnje. Dimljenje mesa sudjeluje u konzerviranju proizvoda od mesa (bakteriostatski i baktericidno, fungistatski i fungicidno), pri čemu dimljenje ima učinak sušenja, povoljnog djelovanja na senzorna svojstva te suzbija oksidativne procese i kvarenje mesnih proizvoda. Sušenje predstavlja postupak konzerviranja kojim se postižu dva osnovna cilja: bolja održivost proizvoda i lakše rukovanje u pohrani i prijevozu suhomesnatih proizvoda. Sušenje kobasica počinje već tijekom fermentacije, dimljenja, a nastavlja se i tijekom zrenja te se kod tradicionalno proizvedenih trajnih kobasica primjenjuju prirodni ili djelomično kontrolirani uvjeti. Njime se postepeno smanjuje sadržaj vode i aktivitet vode kao i usporavanje aktivnosti enzima i postizanje čvršće konzistencije. Tijekom sušenja i zrenja se stvaraju i stabiliziraju senzorne karakteristike koje u konačnici čine razlike između proizvoda. Proces zrenja se odvija tijekom čitavog perioda proizvodnje

kobasica, od trenutka izrade nadjeva, pa sve do pakiranja i skladištenja finalnog proizvoda. Tokom procesa zrenja odvijaju se dva važna biokemijska procesa, a to su proteoliza (hidroliza miofibrilarnih i sarkoplazmatskih proteina) i lipoliza pomoću lipaza i fosfolipaza koje dovode do formiranja slobodnih masnih kiselina i njihovih nusprodukta. Spojevi nastali ovim procesima snažno utječu na razvoj arome, teksture i boje, a njihov je udio veći ako se proizvodnja odvija kroz duži vremenski period pa su kao rezultat toga kobasice proizvedene na tradicionalni način često punijeg i bogatijeg okusa i arome u odnosu na one proizvedene industrijski (Mrkonjić Fuka i Kos, 2015).

2.2. Bakterije mliječne kiseline

Bakterije mliječne kiseline (BMK) prirodno nastanjuju biljke, namirnice, površinu sluznica ljudi i životinja i od davnina imaju široku primjenu u fermentaciji hrane. Glavni rodovi BMK uključuju: *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Pediococcus*, *Leuconostoc* i *Enterococcus* (Lund i Baird - Parker, 2000). Proizvodnjom mliječne kiseline, BMK uzrokuju brzu acidifikaciju sirovina čija je prvenstvena uloga konzerviranje novonastalog proizvoda. Metabolizmom BMK nastaju i drugi produkti (etanol, octena kiselina, diacetil, bakteriocini) koji mogu djelovati inhibitorno ili letalno na mikroorganizme uzročnike kvarenja i patogene vrste s kojima se natječu za istu ekološku nišu ili hranjiva te na taj način stabiliziraju konačni proizvod štiteći ga od kvarenja. Stabilnost i sigurnost prehrambenih proizvoda uključuje stvaranje nepogodnog okruženja za rast patogena i bakterija kvarenja uz istodobnu sposobnost podržavanja rasta i metaboličke aktivnosti korisnih mikroorganizama. Rast i preživljavanje čestih patogena mesa, poput *Salmonella* spp., *Yersinia enterocolitica* i *Campylobacter* spp. obično pokazuju nisku stopu preživljavanja tijekom fermentacije kobasica zbog niskih pH vrijednosti i aktiviteta vode, a *Listeria monocytogenes* je najčešće inhibirana tijekom trećeg tjedna zrenja (Työppönen i sur., 2003). Proizvodnja neurotoksina i rast *Clostridium botulinum* su isto tako ograničeni niskim pH vrijednostima i niskim aktivitetom vode (Peck i Stringer, 2005), dok su na uvjete tijekom fermentacije i zrenja kobasica najotpornije vrste *Staphylococcus aureus* i patogeni sojevi *Escherichia coli* koje predstavljaju i najveću potencijalnu opasnost.

BMK istodobno doprinose okusu, aromi i teksturi proizvoda uz mogućnost povećanja nutricionističke vrijednosti proizvoda u smislu lakše probavljivosti, uklanjanja toksina, probiotičkog djelovanja ili nekog drugog pozitivnog efekta. Većina BMK koje se koriste u proizvodnji hrane su generalno prepoznate kao sigurne, odnosno, imaju GRAS (engl. *generally*

recognized as safe) status i često se mogu primjenjivati kao starter kulture u fermentaciji kobasica s ciljem dobivanja standardiziranih proizvoda i provođenja kontrolirane fermentacije.

2.1.1 Rod *Lactobacillus* s naglaskom na vrstu *Lactobacillus curvatus*

Rod *Lactobacillus* čini više od 150 vrsta (<http://www.bacterio.cict.fr>) bakterija koje pripadaju koljenu *Firmicutes*, redu *Lactobacillales* i porodici *Lactobacillaceae*. Bakterije roda *Lactobacillus* su gram-pozitivne, nesporulirajuće i pojavljuju se u obliku bacila ili kokobacila. Katalaza su negativne, iako neki pokazuju pseudokatalaznu aktivnost (Cai i sur., 2012). Bakterije roda *Lactobacillus* su široko rasprostranjene u prirodi, mogu se naći u hrani kao što su mliječni proizvodi, fermentirano meso, voće, povrće, bezalkoholna pića, ali i u respiratornom, gastrointestinalnom i genitalnom sustavu ljudi i životinja. Laktobacili pokazuju izuzetnu otpornost na kiseli medij i često su prisutni u spontanim prirodnim fermentacijama što ih razlikuje od ostalih rodova. Prisutnost i odsutnost ključnih enzima fruktoza-1,6-difosfat aldoza i fosfoketolaza koje su odgovorne za vrstu fermentacije roda *Lactobacillus* uobičajeno ih svrstava u tri osnovne skupine. U prvu skupinu pripadaju obligatni homofermentativni laktobacili koji rastu na višim temperaturama ($> 45^{\circ}\text{C}$) s obzirom na ostale dvije skupine te su najtolerantnije na kiseli medij. Za početni rast zahtijevaju pH u rasponu 5,5 i 6,2. Nakon fermentacije snižuju $\text{pH} < 4$ (Bergey, 1974). Drugu skupinu čine fakultativno heterofermentativni laktobacili i na posljétku obligatni heterofermentativni koji čine treću skupinu laktobacila (Samaržija, 2015; Collins i sur., 1991; Vandamme i sur., 1996).

Rod *Lactobacillus* jedan je od dominantnih rodova BMK koji provode fermentaciju i zrenje kobasica. Primjerice Papamanoli i sur. (2003) u svom istraživanju navode kako je 90 % izolata BMK prikupljenih iz grčkih suhih kobasica identificirano kao vrste roda *Lactobacillus*. Najčešće izolirane vrste laktobacila iz kobasica su *Lactobacillus sakei*, *Lactobacillus plantarum* i *Lactobacillus curvatus* (Andrighetto i sur., 2001; Fontana i sur., 2005; Rantsiou i sur., 2005; Kozačinski i sur., 2008; Lebert i sur., 2007). *Lb. curvatus* ne raste na temperaturi od 45°C , ali većina sojeva raste na 42 i 4°C , dok samo neki sojevi rastu na 2°C . Prema metabolizmu ova je bakterija fakultativno heterofermentativna i proizvodi DL-mliječnu kiselinu fermentacijom fruktoze, galaktoze, glukoze, maltoze, manoze i riboze. Većina sojeva proizvodi kiselinu iz amigdalina, celobioze, saharoze i trehaloze. Također ne producira amonijak iz arginina. Većina sojeva ne raste u prisutnost 10 % NaCl i ne proizvode acetoin iz glukoze.

U svom istraživanju, Casaburi i sur. (2016) su pokazali da u *in vitro* uvjetima kod pH vrijednosti 4,5 i 4 %-tnoj koncentraciji NaCl, soj *Lb. curvatus* 54M16 može rasti i proizvoditi antagonističke tvari. *Lb. curvatus* 54M16 je izoliran iz tradicionalnih fermentiranih kobasica

regije Campania (Italija) i identificiran pomoću sekvencioniranja 16S rRNA i hsp60 gena, kao i SDS-PAGE proteina stanice. Autori ovog istraživanja su PCR metodom dokazali da *Lb. curvatus* 54M16 nosi gene koji kodiraju za sakacin X, T i P. Sposobnost ovog soja da proizvede više od jednog bakteriocina potvrđena je molekularnom analizom masene spektrometrije i sekvenciranjem N-terminalnih aminokiselina. Najveća produkcija bakteriocina zabilježena je na 30 °C u kasnoj logaritamskoj i ranoj stacionarnoj fazi rasta sa naglim padom produkcije u kasnijim fazama rasta laktobacila. Autori studije dokazali su inhibitorno djelovanje navedenog soja prema *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* i *Brochotrix thermosphacta*. Inhibitorno djelovanje nije zabilježeno prema testiranim gram-negativnim bakterijama kao ni prema nekim laktobacilima i *Staphylococcus aureus*. U svom istraživanju, praćenjem teksture i organoleptičke kvalitete, Biühme i sur. (1996) navode kako su najbolje salame govedeg i svinjskog mesa proizvedene upotrebom mješavine starter kultura koja uključuju upravo *Lb. curvatus* (soj DF 38) i *Microccocus* sp. (soj MC 50) sa čak 92,9 % preferencija ispitivanih sudionika.

3. MATERIJALI I METODE

3.1 Priprema korištenih otopina

3.1.1 Peptonska voda (0,1 %)

Peptonska voda pripremljena je otapanjem 9 g peptona (Biolife, Italija) i 4,5 g NaCl u 900 mL destilirane vode nakon čega je sterilizirana autoklavanjem na 121 °C kroz 15 min.

3.1.2 Fiziološka otopina (0,85 %)

Fiziološka otopina je pripremljena otapanjem 8,5 g NaCl u 1 L destilirane vode. Otopina je sterilizirana u autoklavu tijekom 15 minuta na 121 °C.

3.1.3 Otopina obranog mlijeka (10 %)

Obrano mlijeko (10 %) pripremljeno je otapanjem 100 g obranog mlijeka u prahu (Biolife, Italija) u 1L destilirane vode te sterilizirano autoklavanjem na 110 °C kroz 15 minuta.

3.2 Priprema selektivnih mikrobioloških podloga

3.2.1 MRS tekuća selektivna podloga (De Man, Rogosa and Sharpe Broth.)

MRS tekuća selektivna podloga je pripremljena otapanjem 55,2 g MRS podloge (Biolife, Italija) u 1000 mL destilirane vode. Sterilizirana je autoklavanjem na 121 °C kroz 15 minuta.

3.2.2 MRS kruta selektivna podloga (De Man, Rogosa and Sharpe Agar)

MRS kruta selektivna podloga je pripremljena otapanjem 55,2 g MRS tekuće podloge (Biolife, Italija) i 15 g agara (Biolife, Italija) u 1000 mL destilirane vode. Sterilizirana je autoklavanjem na 121 °C kroz 15 minuta.

3.2.3 LamVab kruta selektivna podloga

LamVab kruta selektivna podloga je pripremljena od tri zasebne komponente, na način kako je opisano u Hartemink i sur. (1997). Prva otopina je sadržala 110,4 g/L tekuće MRS podloge (Biolife, Italija) u koju je dodano 0,5 g/L cistein-HCl i 0,05 g/L zelenog bromokrezola te je pH vrijednost ove otopine namještena na $5,0 \pm 0,1$ upotrebom 4 M HCl prije autoklavanja. Druga komponenta je sadržavala 40 g/L agara, dok je treća pripremljena suspendiranjem 2 mg/mL vankomicin hidroklorida koji je steriliziran filtriracijom pomoću 0,2 µm membranskog filtera (Marck, Germany). Prve dvije komponente sterilizirane su autoklavanjem na 121 °C 15 minuta, nakon čega je agar ohlađen na 50 °C u vodenoj kupelji, dok je prva komponenta ohlađena na sobnoj temperaturi. U 500 mL prve komponente je dodano 10 mL otopine

vankomicin hidroklorida u aseptičnim uvjetima. U MRS-vankomicin smjesu na kraju je dodano 500 mL ohlađenog agara i podloga je odmah razlivena u sterilne petrijevke. Završna koncentracija vankomicina iznosila je 20 mg/L.

3.2.4 KAA kruta selektivna podloga (Kanamycin Aesculin Azide Agar)

KAA kruta selektivna podloga je pripremljena otapanjem 48 g KAA podloge (Biolife, Italija) u 1 L destilirane vode. Zagrijana je do vrenja uz povremeno miješanje. Sterilizirana je autoklavanjem na 121 °C kroz 15 minuta.

3.2.5 VRBG kruta selektivna podloga (Violet Red Bile Glucose Agar)

VRBG kruta selektivna podloga (Biolife, Italija) pripremljena je otapanjem 41,5 g podloge u 1000 mL destilirane vode. Zagrijana je do vrenja uz povremeno miješanje do potpunog otapanja, nakon čega je ohlađena na 45 – 50 °C, dobro je promiješana i raspodijeljena u sterilne petrijeve zdjelice.

3.2.6 CCA kruta selektivna podloga (Chromogenic Coliform Agar)

CCA kruta selektivna podloga (Biolife, Italija) pripremljena je otapanjem 37,9 g podloge u 1000 mL destilirane vode. Zagrijavana je do vrenja uz mućkanje do potpunog otapanja. Sterilizirana je autoklavanjem na 121 °C 15 minuta, potom je ohlađena na 45 – 50 °C i raspodijeljena u petrijeve zdjelice.

3.2.7 DRBC kruta selektivna podloga (Dichloran Rose Bengal Chloramphenicol Agar)

DRBC kruta selektivna podloga (Biolife, Italija) je pripremljena otapanjem 15,5 g podloge u 500 mL destilirane vode te je zagrijana do vrenja do potpunog otapanja. Nakon toga je u podlogu dodana jedna bočica kloramfenikola (100 mg/L). Sterilizirana je autoklavanjem na 121 °C kroz 15 minuta, a zatim ohlađena na 50 °C pomoću vodene kupelji. Na posljétku je dobro promiješana i razdijeljena u petrijeve zdjelice.

3.2.8 BP kruta selektivna podloga (Baird Parker Agar)

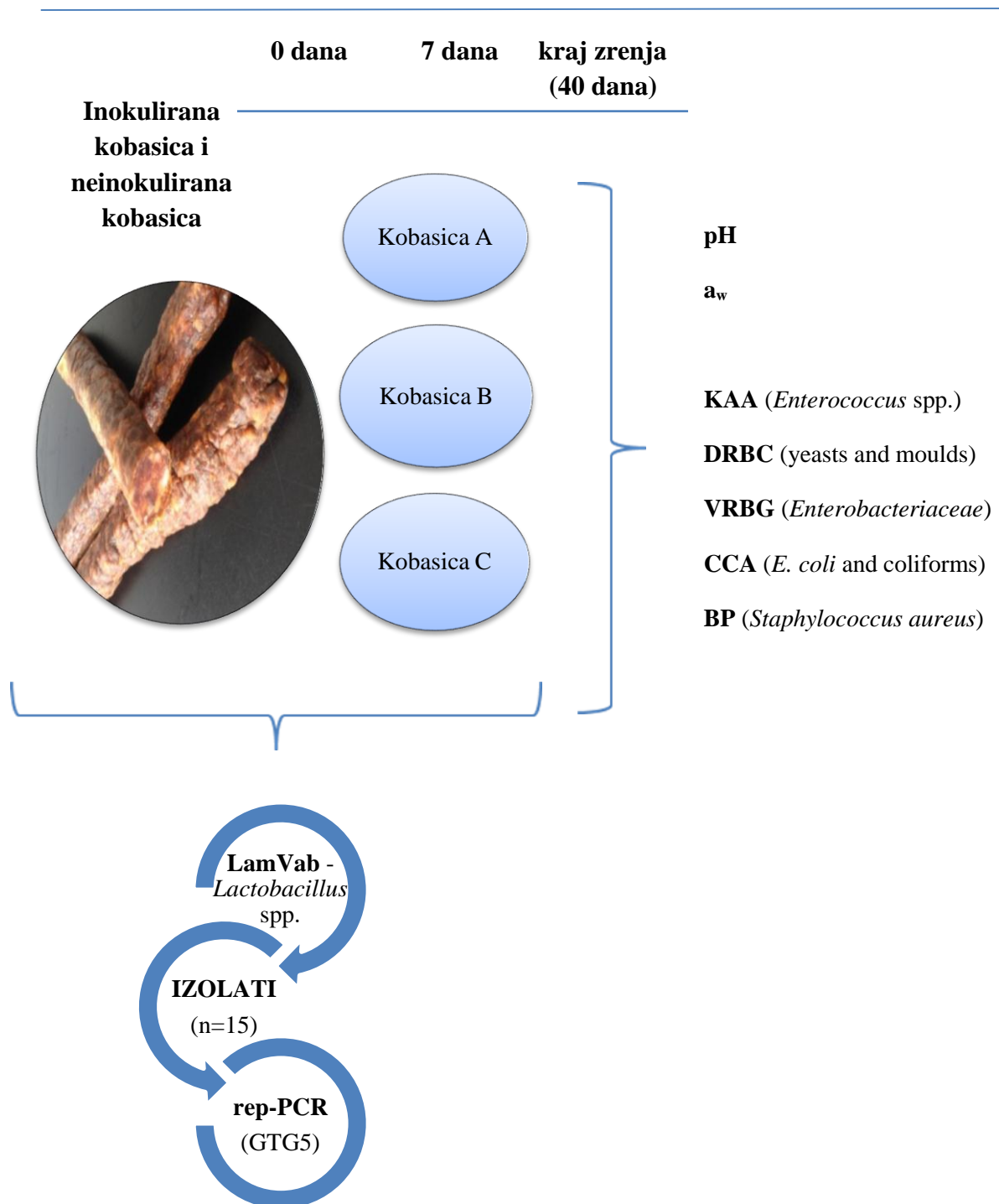
BP kruta selektivna podloga (Biolife, Italija) pripremljena je suspendiranjem 58 g podloge u 1000 mL destilirane vode. Zagrijana je do vrenja uz mućkanje do potpunog otapanja. Sterilizirana je autoklavanjem na 121 °C kroz 15 minuta. Ohlađena je na 50 °C te je u aseptičnim uvjetima dodano 50 mL Egg Yolk Tellurite emulzije (Biolife, Italija). Dobro je promiješana i raspodijeljena u petrijeve zdjelice.

3.3 Uzgoj biomase soja *Lb. curvatus* MRS_532

Kako bi se soj *Lb. curvatus* MRS_532 uzgajao u dovoljnoj biomasi za inokulaciju u mesnu smjesu za proizvodnju kobasica, soj je prvo uzgojen na MRS krutoj selektivnoj podlozi. Jedna kolonija je zatim precijepljena u 100 mL MRS tekuće podloge. Nakon inkubacije na 30 °C tijekom 12 sati, kultura je obojana metodom po Gramu i mikroskopirana, čime su utvrđene morfološke karakteristike laktobacila (gram pozitivni bacili). Stanice su zatim peletirane centrifugiranjem (8000 g, 5 min), a dobiveni peleti su 2 puta isprani sterilnom fiziološkom otopinom i resuspendirani u 100 mL otopine obranog mlijeka (10 %). Ovako pripremljene suspenzije su čuvane i transportirane na 4 °C do inokulacije u smjesu za pripremu kobasica. Prije inokulacije, odvojen je po 1 mL pripremljenih suspenzija i napravljena je serija razrjeđenja, nakon čega je po 100 µL odgovarajućih razrjeđenja naciijepljeno na krute MRS podloge u 2 ponavljanja. Podloge su inkubirane na 30 °C tijekom 72 h u anaerobnim uvjetima nakon čega su izbrojane narasle kolonije i određena je CFU vrijednost naraslih laktobacila.

3.4 Uzorkovanje

Kobasice su proizvedene na obiteljsko-poljoprivrednom gospodarstvu u okolici Požege. Prema njihovoj recepturi, kobasice su izrađene od mješavine mesa domaće i divlje svinja u omjeru 3:2. Meso je začinjeno sa 1,91 % soli, 0,51 % ljute paprike, 0,20 % slatke paprike, 0,31 % bijelog luka, 0,20 % šećera i 0,10 % papra. Mesna smjesa je zatim dobro izmiješana i odvojena u 2 zasebne šarže, po 15 kg svaka šarža. Prva šarža je korištena kao neinokulirana kontrola, dok je u mješavinu mesa za proizvodnju kobasica kod druge šarže, inokuliran soj *Lactobacillus curvatus* MRS_532 resuspendiran u 100 mL obranog mlijeka, odnosno dodano je 9,64 log CFU/mL biomase pripremljenog soja. Mesne smjese su zatim punjene u prirodne ovitke i stavljene u zrionicu pod kontroliranim uvjetima. Uzorci istraživanih (inokuliranih) i kontrolnih kobasica uzeti su u triplicatima nakon 0 i 7 dana, kao i nakon 40 dana tj. na samom kraju zrenja (gotovi proizvodi) te su odmah analizirani na Agronomskom fakultetu, Zavodu za mikrobiologiju. Na Slici 2 shematski je prikazan dizajn eksperimenta.



Slika 2. Shematski prikaz dizajna eksperimenta.

Uzorci tradicionalnih kobasica od mesa divljači (inokulirana kobasica i neinokulirana kobasica) su prikupljeni u triplicatima (A, B, C) tijekom različitih faza (nakon 0, 7 i 40 dana). Određena im je pH vrijednost i aktivitet vode (a_w). Sa LamVab krutih podloga selektivnih za laktobacile nasumično je prikupljeno po 5 izolata sa svakog ponavljanja za svaku fazu (0, 7, 40), odnosno ukupno 15 izolata po fazi. DNA prikupljenih izolata je korištena u rep-PCR reakciji za njihovu genotipizaciju. Različite selektivne podloge su korištene za analizu mikrobiološke kvalitete kobasica.

3.5 Određivanje pH vrijednosti i aktiviteta vode (a_w)

Mjerenje pH je provedeno upotrebom pH metra IQ 150 (IQ Scientific Instruments, SAD) opremljenog tipskom elektrodom BlueLine 21 pH (Schott AG, Njemačka) koja je umetnuta izravno u uzorke kobasica. Aktivitet vode (a_w) mjeren je pomoću Rotronic HygroPalm HP23-AW-A uređaja (Švicarska). Za svaki uzorak izračunata je srednja vrijednost i standardna devijacija temeljem tri neovisna mjerenja.

3.6 Izolacija laktobacila, određivanje CFU vrijednosti i pročišćavanje

Po 25 g uzorka (bez ovitka) svake kobasice je aseptički preneseno u sterilne plastične vrećice i homogenizirano 60 s sa 225 mL peptonske vode (0,1 %) (vidi: 4.1.1.) koristeći Stomacher Lab-Blender 400 (Seward Medical, UK). Homogenizirani uzorci su korišteni za pripremu serije razrjeđenja u peptonskoj vodi (0,1 %) u omjeru 1:10, te je po 100 μ L odgovarajućih razrjeđenja prebačeno na LamVab medij u duplikatima. Inokulirana kultura je razmazana L-štapićem i inkubirana u anaerobnim uvjetima na 30 °C tijekom 72 sata, nakon čega su izbrojane kolonije karakteristične morfologije i određena je CFU vrijednost. CFU vrijednost je određena na način da su brojane pojedinačne kolonije laktobacila na razrjeđenju gdje se njihov broj kretao 10 – 300. Broj mikroorganizama koji formiraju kolonije (CFU/mL ili g) je izračunat prema formuli: $CFU = \text{broj kolonija} / \text{faktor razrjeđenja}$. Sa razrjeđenja koje je korišteno za određivanje CFU vrijednosti nasumično je izabrano po 5 kolonija sa svakog ponavljanja (A, B, C). Uzete kolonije iscrpljene su na MRS agaru (minimalno dva puta) sve do dobivanja čiste kulture laktobacila, što je potvrđeno bojanjem po Gramu i katalaza testom (3 % H_2O_2). Potom je izabrana po 1 narasla monokultura sa svake ploče i sterilno precijepljena u 2 mL tekuće MRS podloge, te je ostavljena na inkubaciji tijekom 24 sata na 37 °C. Nakon inkubacije, odvojen je po 1 mL podloge s naraslim monokulturama kojima je dodano po 1 mL glicerola (20 %) te su tako pripremljeni izolati pohranjeni -80 °C, a preostali 1 mL podloge s naraslim izolatima iskorišten je za izolaciju DNA.

3.7 Mikrobiološka analiza uzoraka kobasica

Za detekciju određenih mikrobnih skupina, uzorci kobasica su homogenizirani na način kako je to opisano u poglavlju 3.6. Odgovarajuća razrjeđenja homogeniziranih uzoraka pripremljena su u peptonskoj vodi i inokulirana u duplikatima na različitim selektivnim medijima. Za detekciju broja *Enterococcus* spp., *Staphylococcus aureus* te kvasaca i plijesni, po 100 µL odgovarajućih razrjeđenja je prebačeno na selektivne medije u duplikatima i razmazano je L-štipićem. Enterokoki su prebrojani na Kanamycin Esculine Azid agaru (KAA; Biolife, Italija) (vidi: 4.2.3.) inkubiranjem na 37 °C kroz 48 h. *Staphylococcus aureus* određen je na Baird Parker agaru (BP; Biolife, Italija) (vidi: 4.2.8.), nadopunjenom s Egg Yolk Tellurite emulzijom (20%; VWR International AG) te inkubiranim na 37 °C, 48 h. Kvasci i plijesni su prebrojani na Dichloran Rose-Bengal Chloramphenicol agaru (DRBC; Biolife, Italija) (vidi: 4.2.6.) sa dodanim kloramfenikolom, nakon inkubacije na 25 °C tijekom 5 dana pod aerobnim uvjetima prema ISO 21527.

E.coli i koliformne bakterije su detektirani na način da je po 1 mL odgovarajućeg razrjeđenja homogeniziranog uzorka prebačeno u prazne sterilne petrijevke, u duplikatima, nakon čega je dodano 25 mL Chromocult Coliform ES agara (CCA; Biolife, Italija) (vidi: 4.2.5.), ohlađenog na 50 °C. Ovako pripremljene ploče su lagano promiješane kružnim pokretima u obje strane, kako bi se inokulirane stanice ravnomjerno rasporedile u selektivnoj podlozi. Ploče su inkubirane na 37 °C tijekom 24 h, prema ISO 4832: 2006. Broj *Enterobacteriaceae* određen je prema ISO 21528-2:2004, koristeći Violet Red Bile Glucose agar (VRBGA; Biolife, Italija) (vidi: 4.2.4.), koji je pripremljen na prethodno opisan način, ali je nakon polimerizacije inokuliranog agara, apliciran dodatni sloj sterilnog VRBG medija ohlađenog na 50 °C.

3.8 Izolacija DNA

Iz monokultura prikupljenih sa LamVab selektivne podloge, izolirana je DNA pomoću Wizard® Genomic DNA Purification Kita, prema uputama proizvođača (Promega, Madison, Wisconsin, USA). 1 mL prekonoćne kulture narasle u MRS tekućoj podlozi je centrifugiran 2 minute na 16 000 x g kako bi se stanice nataložile (peletirale), nakon čega je odliven dobiveni supernatant. Staložene stanice (peleti) su resuspendirane u 480 µL 50 mM EDTA. Nakon toga dodano je 120 µL lizozima kako bi tijekom inkubacije od 30 minuta na 37 °C došlo do razaranja stanične stijenke stanice. Uslijedilo je centrifugiranje (2 minute, 16 000 x g) i uklonjen je supernatant. Dobiveni peleti su resuspendirani u 600 µL Nuclei Lysis Solution i inkubirani na 80 °C tijekom 5 minuta kako bi došlo do potpune lize stanica. Zatim su peleti ohlađeni na sobnu temperaturu i dodano je 3 µL RNase Solution, te su dalje inkubirani na 37 °C, tijekom 60

minuta. Dodano je 200 μL Protein Precipitation Solution, pomiješano vorteksiranjem i dalje inkubirano tijekom 5 minuta na ledu. Nakon inkubacije, suspenzija je centrifugirana 3 minute na 16 000 x g, kako bi se nataložili i uklonili proteini. Supernatant je odliven u čistu tubicu i pomiješan sa 600 μL isopropanola sobne temperature i centrifugiran (1 minuta, 16 000 x g). Zatim je dobiveni supernatant prebačen u 70 % etanol i centrifugiran (1 minuta, 16 000 x g) kako bi se DNA staložila. Supernatant je odliven, a peleti su osušeni tijekom 10 – 15 minuta na zraku. Na posljetku je pelet (DNA) rehidriran u 100 μL Rehydration Solution na 4 °C preko noći. Dobivena DNA korištena je u daljnjim molekularno-mikrobiološkim analizama.

3.9 Određivanje sposobnosti preživljavanja rep-PCR metodom

Izolati prikupljeni sa LamVab medija su genotipizirani rep-PCR metodom. Pripremljena je reakcijska smjesa ukupnog volumena 25 μL , a korišteni reagensi i njihovi volumeni i koncentracije su navedeni u Tablici 2. Reakcija je provedena u PCR uređaju ProFlex PCR System (Applied biosystems, SAD) pri uvjetima navedenima u Tablici 3. Korištena je početnica GTG5 sa sekvancom 5' – 3' GTGGTGGTGGTGGTG (Švec i sur., 2005).

Dobiveni rep-PCR produkti su razdvojeni na 2 % agaroznom gelu na 90 V tokom 80 min, a dobiveni obrasci analizirani pomoću BioNumerics 7.6.1. programa (Applied Maths, Belgium). Dice koeficijent je korišten za računanje genetske sličnosti izolata, a UPGMA (Unweight Paired Group Arithmetic Average) metoda je korištena za klasteriranje. Izabrana je toleranca od 1,0 % i optimizacija od 0,5 % za kreiranje dendrograma.

Tablica 2. Reagensi korišteni za pripremanje reakcijske smjese za rep-PCR.

Reagens	Početni volumen (μL)	Početna koncentracija	Završna koncentracija
Pufer (Finnzymes)	2,5	10x	1x
dNTP	1	10 mM	0,1 mM
GTG5 početnica	1	50 pmol	2 pmol
DyNAzyme Polimeraza	1	2 U/ μL	1 U
Voda	18,5		
DNA	1		

Tablica 3. Temperaturni profil rep-PCR reakcije.

Dijelovi PCR reakcije	Temperatura ($^{\circ}\text{C}$)	Trajanje
Početna denaturacija	95	7 min
30 ciklusa amplifikacije:		
• Denaturacija	90	30 sek
• sparivanje klice s kalupom	40	1 min
• sinteza komplementarnih lanaca DNA	65	8 min
Završno produljivanje lanaca	65	16 min

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1 Fizikalna svojstva kobasica

Fermentirane kobasice rezultat su biokemijskih, mikrobioloških, fizikalnih i senzorskih promjena koje se javljaju tijekom fermentacije i zrenja u definiranim uvjetima temperature i relativne vlažnosti (Villani i sur., 2007). Fermentacija kobasica uključuje složene procese (smanjenje pH, promjene početne mikroflore, redukciju nitrata u nitrite, stvaranje nitrozomioglobina, solubilizaciju i gelifikaciju miofibrilnih i sarkoplazmatskih proteini, proteolitičke, lipolitičke i oksidacijske pojave kao i dehidraciju) koji rezultiraju značajnim promjenama početnih karakteristika.

Iz rezultata dobivenih mjerenjem pH vrijednosti, kod kobasice s inokuliranim sojem *Lb. curvatus* MRS_532 utvrđeno je da se prosječna pH vrijednost od 5,56 (0. dan) spustila na 5,22 (7. dan) nakon čega je opet porasla na 5,31 (40. dan), što je prikazano u Tablici 4. Kod neinokulirane kontrole pH vrijednost je nastavljala padati tijekom čitavog procesa fermentacije i zrenja, što je prikazano u Tablici 5. Usporedbom pH vrijednosti između istraživane i kontrolne kobasice u 0. danu proizvodnje, Studentskim t-testom nisu pronađene značajne razlike ($p > 0,05$). Međutim, izmjereni pH je bio značajno niži kod inokulirane kobasice nakon 7 dana fermentacije ($p < 0,001$) i na kraju zrenja ($p < 0,05$) u odnosu na kontrolu. Budući da je glavna uloga BMK u fermentaciji kobasica zakiseljavanje mesne smjese, odnosno spuštanje pH vrijednosti stvaranjem kiselina, prvenstveno mliječne kiseline, ovakav se pad pH vrijednosti kod inokulirane kobasice može objasniti kao rezultat metaboličke aktivnosti dodanog starter soja (Graf 1).

Aktivitet vode (a_w) je pokazao konstantan pad tijekom fermentacije i zrenja kobasica (Tablica 4 i Tablica 5). Kod inokulirane kobasice je a_w vrijednost pala sa 0,96 (0. dan) na 0,88 (kraj zrenja), a kod kontrolne sa 0,96 (0. dan) na 0,87 (kraj zrenja). Vignolo i sur. (2010) navode kako suhe fermentirane kobasice spremne za jelo obično karakterizira pH vrijednost između 5,2 - 5,8, i aktivitet vode (a_w) između 0,85 - 0,91, a temeljem dobivenih rezultata naše se kobasice kreću upravo u tom rasponu vrijednosti.

Tablica 4. Izmjerene pH vrijednosti i aktivitet vode (a_w) tijekom određenih vremenskih intervala u kobasici s inokuliranim sojem *Lb. curvatus* MRS_532. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost triju nezavisnih mjerenja \pm standardna devijacija.

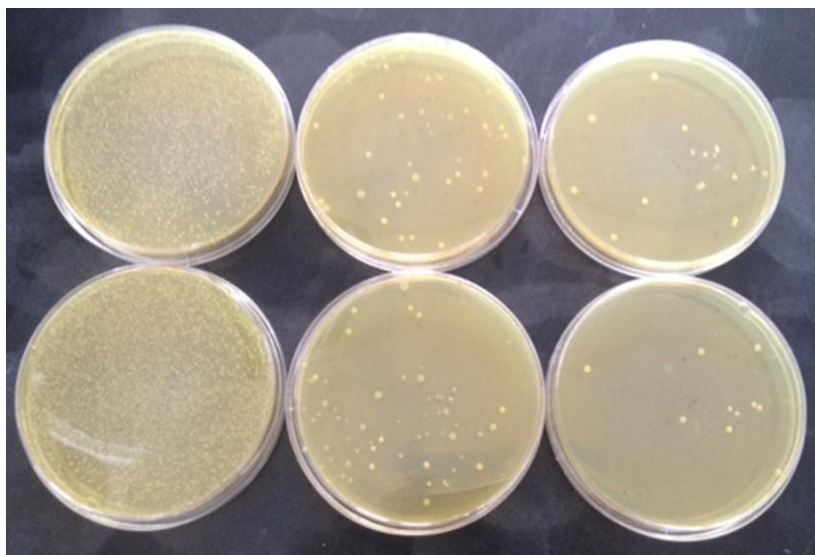
Kobasica inokulirana sa sojem <i>Lb. curvatus</i> MRS_532			
	Dani		
	0	7	40 (kraj zrenja)
Prosječna pH vrijednost \pm standardna devijacija	5,56 \pm 0,02	5,22 \pm 0,02	5,31 \pm 0,03
Prosječni aktivitet vode (a_w) \pm standardna devijacija	0,96 \pm 0,00	0,95 \pm 0,00	0,88 \pm 0,03

Tablica 5. Izmjerene pH vrijednosti i aktivitet vode (a_w) tijekom određenih vremenskih intervala u neinokuliranoj kontroli. Rezultati su izraženi kao srednja vrijednost triju nezavisnih mjerenja \pm standardna devijacija.

Neinokulirana kontrola			
	Dani		
	0	7	40 (kraj zrenja)
Prosječna pH vrijednost \pm standardna devijacija	5,59 \pm 0,04	5,50 \pm 0,02	5,43 \pm 0,03
Prosječni aktivitet vode (a_w) \pm standardna devijacija	0,96 \pm 0,00	0,95 \pm 0,00	0,87 \pm 0,02

4.2 Prikupljanje izolata laktobacila i određivanje njihove CFU vrijednosti

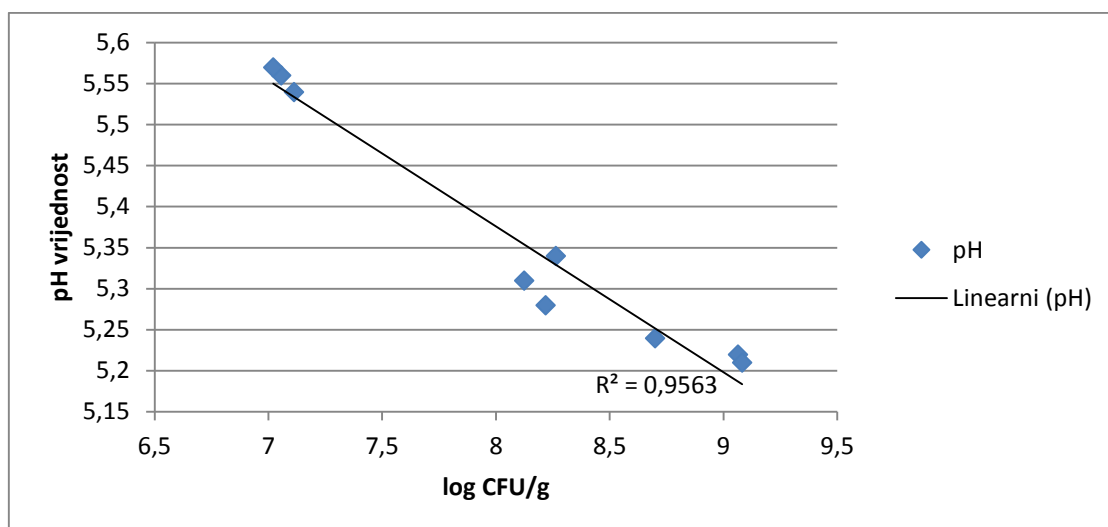
S LamVab selektivnih podloga (Slika 3) je prikupljeno 38 izolata iz kobasice inokulirane sa sojem *Lb. curvatus* MRS_532 i 43 izolata iz neinokulirane kobasice (kontrolne). Izolati su prikupljeni nakon 0, 7 i 40 dana, a iz svih prikupljenih izolata je izolirana DNA, koja je korištena u rep-PCR reakcijama za njihovu genotipizaciju.



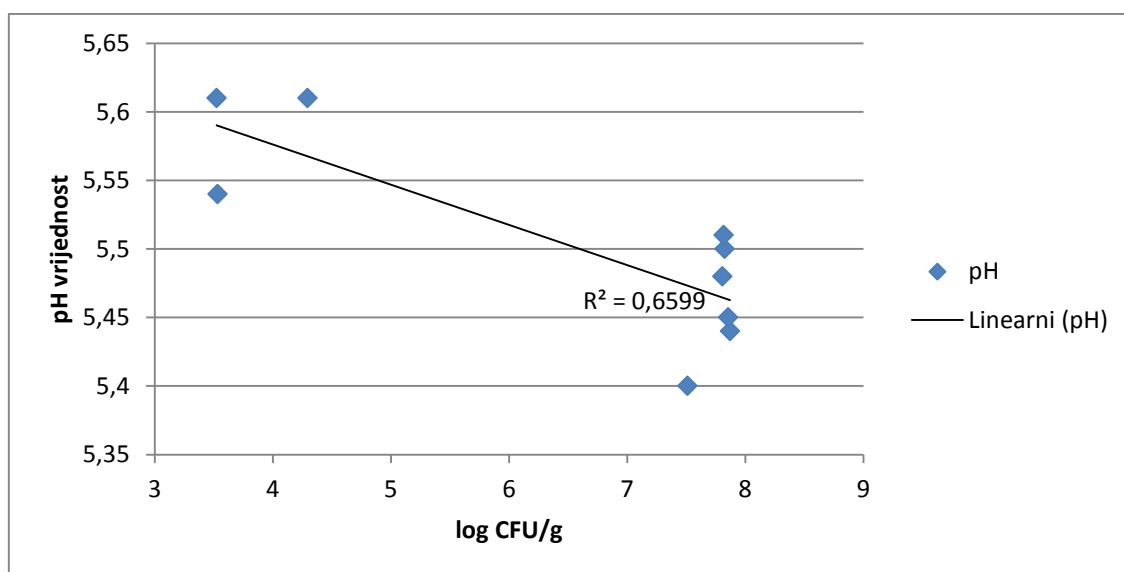
Slika 3. Laktobacili detektirani na LamVab selektivnoj podlozi pri različitim razrjeđenjima.

U Tablici 6 (vidi: 4.3.) je prikazan broj laktobacila naraslih tijekom fermentacije i zrenja inokulirane i kontrolne kobasice. Kod obje kobasice je broj laktobacila niži u početku (0. dan), nakon čega raste (7. dan) i stabilizira se na kraju zrenja. Kod kontrolne kobasice je broj laktobacila na samom početku proizvodnje (0. dan) iznosio 3,78 log CFU/g, dok je kod kobasice inokulirane sa starter sojem *Lb. curvatus* MRS_532 bio značajno veći ($p < 0,05$) i iznosio 7,06 log CFU/g. Broj laktobacila je u inokuliranoj kobasici ostao značajno veći od broja laktobacila u kontrolnoj kobasici tijekom svih faza fermentacije i zrenja.

U našem istraživanju potvrđena je korelacija između porasta broja laktobacila i pada pH vrijednosti (Graf 1 i Graf 2) kod inokulirane kobasice ($r = -0,98$, $p < 0,001$) i kod kontrolne kobasice ($r = -0,81$, $p < 0,01$).



Graf 1. Stupanj korelacije između pH vrijednosti i broja laktobacila detektiranih na LamVab podlozi (log CFU/g) kod inokulirane kobasice.



Graf 2. Stupanj korelacije između pH vrijednosti i broja laktobacila detektiranih na LamVab podlozi (log CFU/g) kod neinokulirane kobasice.

4.3 Mikrobiološka analiza

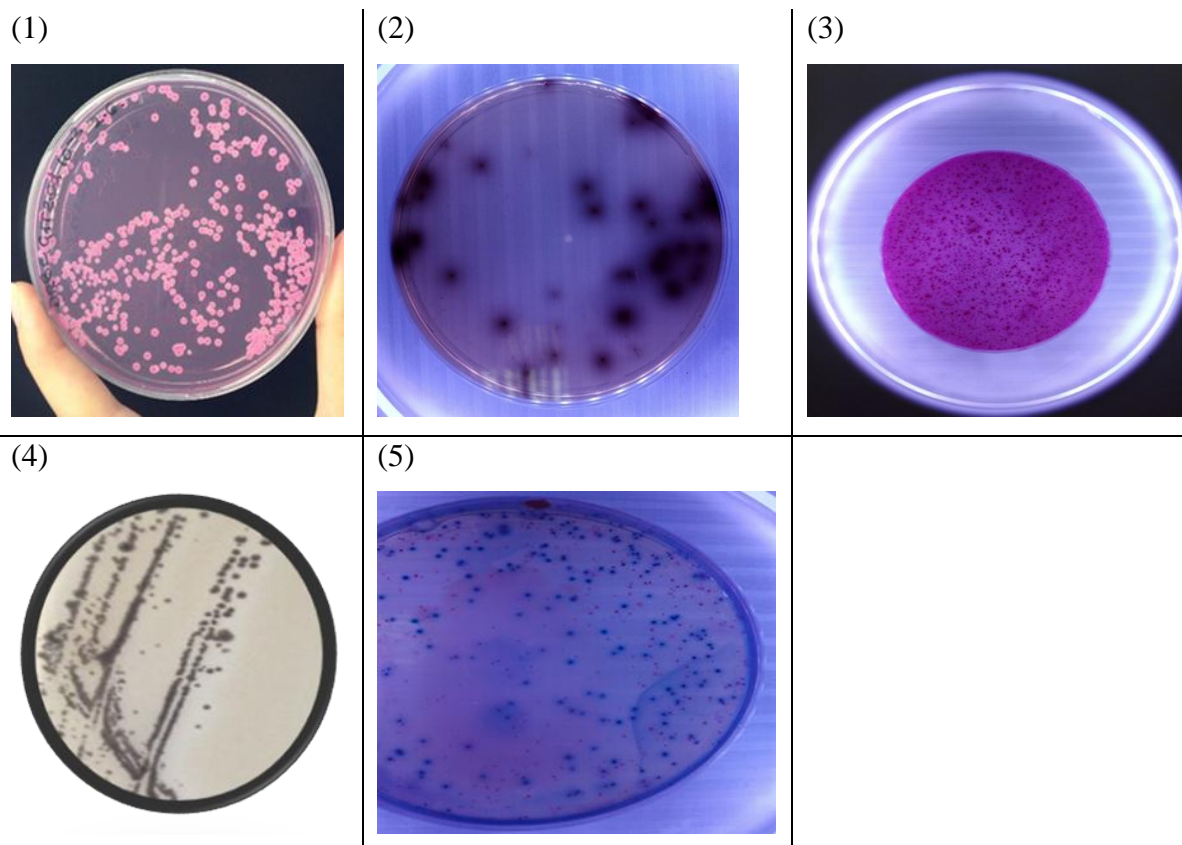
U Republici Hrvatskoj su Pravilnikom o mikrobiološkim kriterijima za hranu (NN 74/08) propisane najveće dopuštene vrijednosti pojedinih mikroorganizama u određenom tipu namirnice. Da bi, prema Pravilniku, rezultat bio prihvatljiv, *Listeria monocytogenes* smije biti detektirana do najvećeg iznosa od 2 log CFU/g, dok *Salmonella* spp. mora biti odsutna u 25 g uzorka.

Kao nadopuna Pravilniku, izdan je i Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (2011) kojim je preporučeno detektiranje broja određenih mikroorganizama u različitim namirnicama. U trajnim kobasicama i drugim trajnim suhomesnatim proizvodima preporuča se određivanje brojnosti *Enterobacteriaceae*, sulfitreducirajućih klostridija i koagulaza pozitivnih stafilokoka / *Staphylococcus aureus*. Da bi zadovoljili kriterije, od ukupno 5 prikupljenih uzoraka, maksimalno 1 uzorak smije biti u rasponu između 1-2 log CFU/g, dok ostali uzorci moraju biti < 1 log CFU/g.

Rezultati mikrobiološke analize u ovom istraživanju prikazani su u Tablici 6. Na Slici 4 prikazani su korišteni mikrobiološki mediji s naraslim kolonijama tipičnim za određenu mikrobiološku skupinu. Na DRBC mediju u niti jednoj fazi nisu detektirane plijesni, dok je broj kvasaca kod istraživane i kontrolne kobasice sa početnih 3,7 i 4,2 log CFU/g (0. dan), pao nakon 7. dana (3,37 i 3,28 log CFU/g) te opet narastao na kraju zrenja (40. dan) na 4,72 i 5,25 log CFU/g. Broj enterokoka u suhim fermentiranim kobasicama može biti varijabilan i uglavnom ovisi o higijenskoj kvaliteti sirovine (Comi i sur., 2005; Kozačinski i sur., 2006). Zakonodavstvo na snazi (Uredba Komisije (EC) br. 1441/2007) ne postavlja granice za enterokoke u hrani. Enterokoki prisutni u velikom broju u hrani mogu ukazivati na fekalnu kontaminaciju; međutim, enterokoki također mogu doprinositi senzornim karakteristikama proizvoda zbog njihove proteolitičke i lipolitičke aktivnosti. U ovom istraživanju, enterokoki su detektirani tijekom svih vremenskih intervala kod obje kobasice, iako su u najmanjem broju detektirani nakon 40. dana, odnosno kod gotovih inokuliranih kobasica detektirani su u broju od 3,45 log CFU/g, a kod kontrolnih 3,68 log CFU/g. Kod uzoraka gotovih kobasica broj enterobakterija je bio veći od najveće dopuštene vrijednosti od 1,00 log CFU/g kako je propisano Vodičem, odnosno, bio je 2,06 log CFU/g kod inokulirane kobasice i 2,68 log CFU/g kod kontrolne kobasice. Međutim, detektirani broj *Enterobacteriaceae* na kraju zrenja kod obje kobasice ne premašuje granicu od 3 log CFU/g koje je odredilo Njemačko društvo za higijenu i mikrobiologiju (DGHM, 2004). Iz navedenog je vidljivo da propisi za tip proizvoda, kao što su fermentirane kobasice, kojima se definiraju granične vrijednosti i postupci određivanja

patogena i bakterija uzročnika kvarenja nisu potpuno ujednačeni na razini Europske unije. Broj koliformnih bakterija je kod gotove kontrolne kobasice bio 2,42 log CFU/g, dok je kod inokulirane kobasice zabilježen u manjem broju (2,06 log CFU/g). Prema mikrobiološkom vodiču za hranu spremnu za jelo (*Microbial Guidelines for Ready-to-Eat Foods*, Health Canada, 2010) zadovoljavajućim se smatra rezultat manji od 2 log CFU/g, dok se rezultat manji od 3 log CFU/g smatra graničnim. Granični rezultat podrazumijeva pripadnost unutar prihvatljivih mikrobioloških kriterija, no može ukazivati na lošu kvalitetu izvornih sastojaka, nepropisno rukovanje ili skladištenje namirnica te neodgovarajuće sanitarne uvjete proizvodne jedinice. Broj *E. coli* je sa početne vrijednosti od 3,67 log CFU/g (inokulirana kobasica) i 3,59 log CFU/g (kontrola) pao na < 1 log CFU/g kod obje kobasice na kraju zrenja (40. dan), dok je *S. aureus* kod obje kobasice detektiran u broju manjem od 1 log CFU/g tijekom svih vremenskih intervala. Generalno su oportunistički patogeni i bakterije kvarenja detektirani u manjem broju kod inokulirane kobasice u odnosu na kontrolnu kobasicu, vjerojatno kao rezultat rasta, razmnožavanja i metaboličke aktivnosti dodane starter kulture.

Saznanja o mikrobiološkom sastavu i kvaliteti kobasica od divljači, naročito onih proizvedenih u Hrvatskoj, su veoma limitirana. U jednom takvom istraživanju, Markov i sur. (2013) su mikrobiološki karakterizirali kobasice proizvedene u Hrvatskoj od različitih vrsta mesa divljači. Rezultati su pokazali kako *Salmonella* spp., sulfitreducirajuće klostridije i *L. monocytogenes* nisu pronađene niti u jednoj od kobasica, dok je kod nekih uzoraka kobasica od vepra i miješane kobasice od domaće i divlje svinje broj enterobakterija bio > 1,0 log CFU/g. Budući da je *S. aureus* detektiran ≥ 1 log CFU/g, niti jedna od kobasica nije zadovoljila uvjete propisane u Vodiču za mikrobiološke kriterije za hranu (2011). Marty i sur. (2012) u svom istraživanju ističu da 9 od ukupno 14 tradicionalnih švicarskih kobasica proizvedenih od mesa divljači ili mesa životinja iz ekstenzivnog uzgoja predstavlja rizik za zdravlje zbog visokog broja detektiranih (log CFU/g) *S. aureus* i *Enterobacteriaceae*.



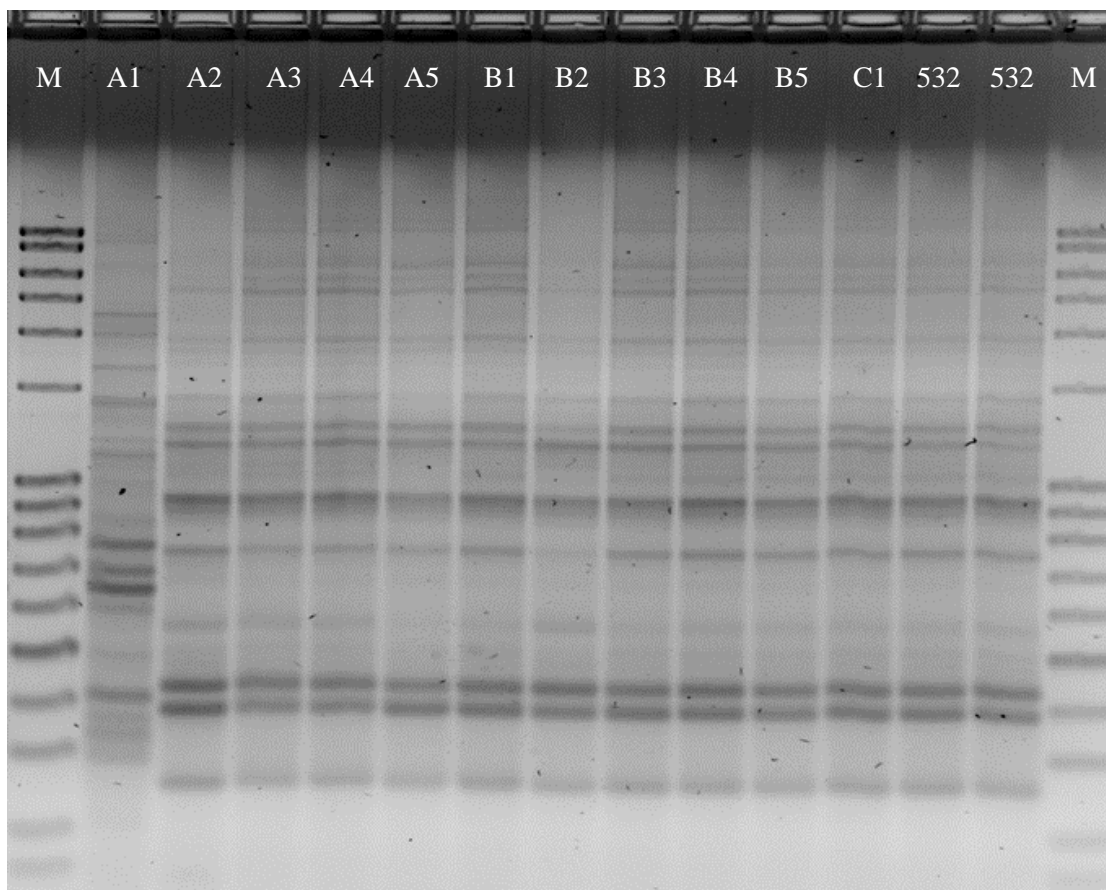
Slika 4. Mikrobiološki mediji korišteni u ovom istraživanju s naraslim kolonijama tipičnim za određenu mikrobiološku skupinu. Na slici je prikazan DRBC medij s naraslim kvascima (1), KAA s naraslim enterokokima (2), VRBG s naraslim enterobakterijama (3), BP s naraslim *S. aureus* (4) i CCA s naraslim *E. coli* (plave kolonije) i koliformne bakterije (ružičaste kolonije) (5).

Tablica 6. Brojnost određenih mikrobnih skupina kod kobasica s inokuliranim sojem *Lb. curvatus* MRS_532 i neinokulirane kontrolne kobasice, detektiranih na selektivnim krutim podlogama u određenim vremenskim intervalima (0, 7 i 40 dana). Rezultati su izraženi kao log CFU/g \pm standardna devijacija.

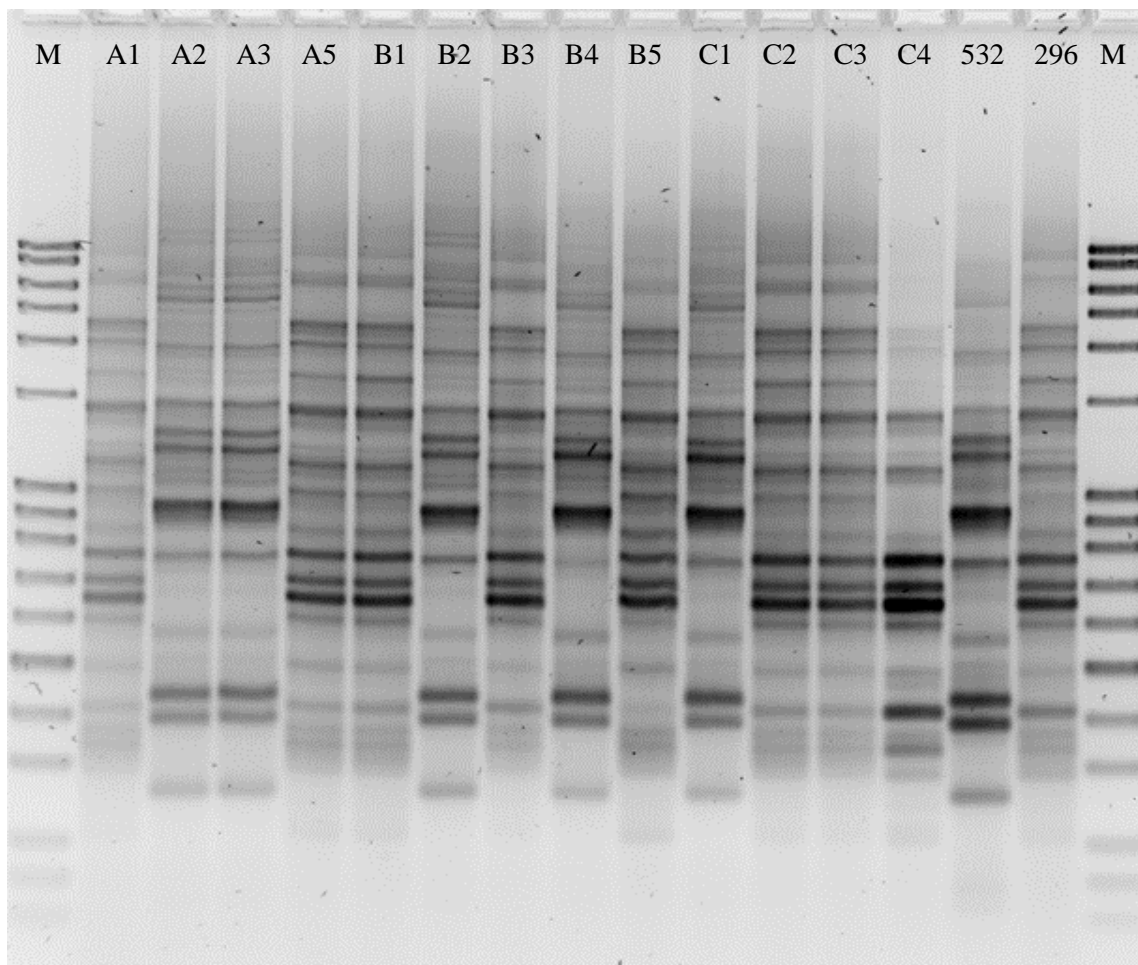
	Krute selektivne podloge	Detektirana mikrobn skupina	Broj detektiranih mikroorganizama (log CFU/g \pm st. dev.) u određenim vremenskim intervalima		
			0 dan	7 dan	40 dana (kraj zrenja)
Kobasica inokulirana sa <i>Lb. curvatus</i> MRS_532	LamVab	Laktobacili	7,06 \pm 0,04	8,95 \pm 0,01	7,87 \pm 0,10
	KAA	Enterokoki	4,36 \pm 0,02	4,16 \pm 0,01	3,45 \pm 0,05
	VRBG	Enterobakterije	3,95 \pm 0,22	3,39 \pm 0,01	2,06 \pm 0,05
	CCA	<i>E. coli</i>	3,67 \pm 0,01	2,34 \pm 0,13	< 1,00
	CCA	Koliformne bakterije	4,38 \pm 0,06	3,04 \pm 0,01	2,27 \pm 0,02
	DRBC	Kvasci	3,7 \pm 0,01	3,37 \pm 0,09	4,72 \pm 0,12
	BP	<i>S. aureus</i>	< 1,00	< 1,00	< 1,00
Neinokulirana kontrola	LamVab	Laktobacili	3,78 \pm 0,44	7,82 \pm 0,01	7,75 \pm 0,01
	KAA	Enterokoki	4,17 \pm 0,07	4,26 \pm 0,05	3,68 \pm 0,03
	VRBG	Enterobakterije	4,77 \pm 0,20	3,97 \pm 0,03	2,68 \pm 0,03
	CCA	<i>E. coli</i>	3,59 \pm 0,21	2,04 \pm 0,06	< 1,00
	CCA	Koliformne bakterije	3,9 \pm 0,01	2,91 \pm 0,05	2,42 \pm 0,02
	DRBC	Kvasci	4,22 \pm 0,09	3,28 \pm 0,03	5,25 \pm 0,08
	BP	<i>S. aureus</i>	< 1,00	< 1,00	< 1,00

4.4 Analiza rep-PCR obrazaca

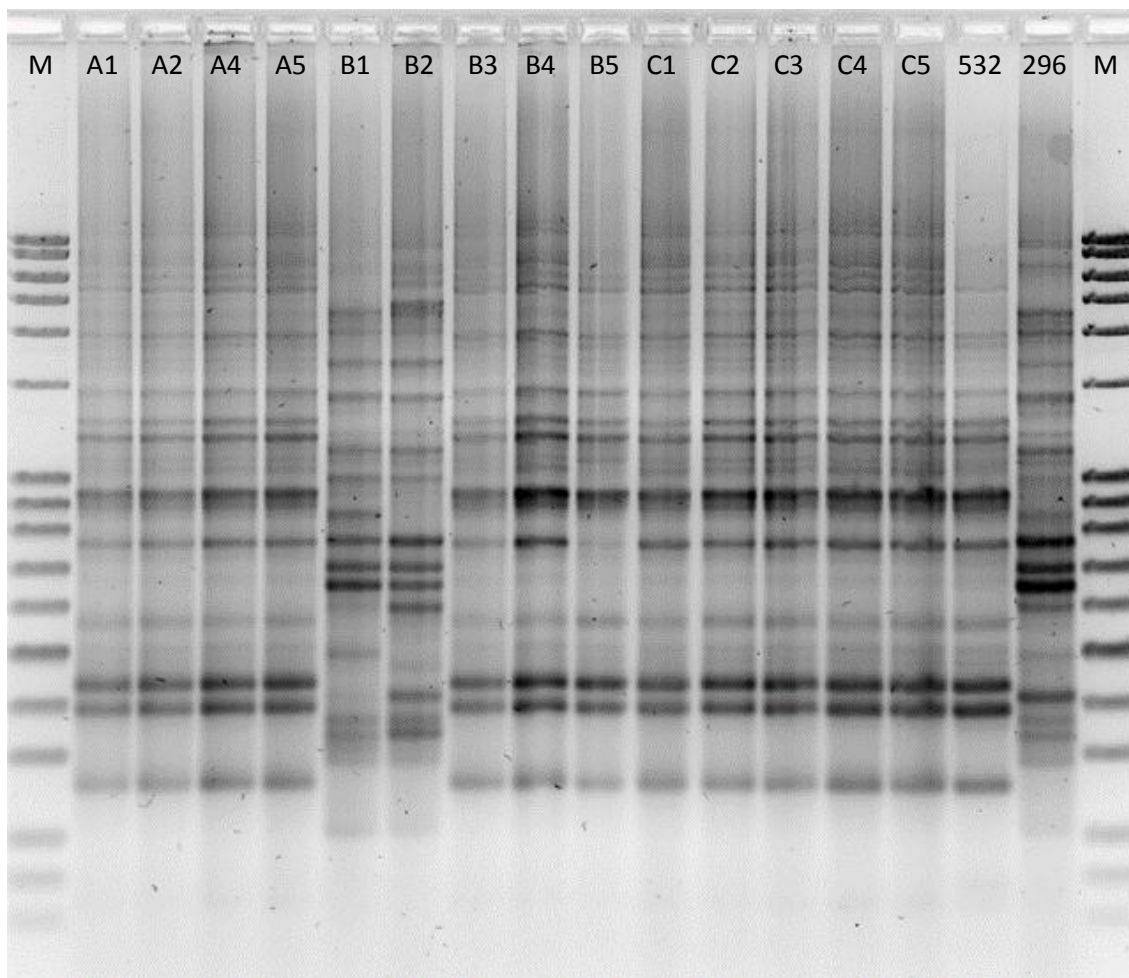
DNA izolata prikupljenih sa LamVab selektivne podloge iz kobasice inokulirane sa *Lb. curvatus* MRS_532 (n=38) i neinokulirane kontrolne kobasice (n=43) tijekom različitih vremenskih intervala (0, 7 i 40 dana) je amplificirana u rep-PCR reakciji koristeći GTG5 početnicu. Na Slikama 5, 6 i 7 prikazani su dobiveni rep-PCR obrasci izolata prikupljenih iz inokulirane kobasice.



Slika 5. Rep-PCR produkti dobiveni amplifikacijom DNA izolata prikupljenih iz uzoraka kobasice inokulirane sa sojem *Lb. curvatus* MRS_532 nakon 0 dana proizvodnje. Oznake redaka: M=marker (1 kb, Roth); A1-5=izolati prikupljeni sa repeticije A; B1-5=izolati prikupljeni sa repeticije B; C1=izolat prikupljen sa repeticije C; 532=soj *Lb. curvatus* MRS_532.



Slika 6. Rep-PCR produkti dobiveni amplifikacijom DNA izolata prikupljenih iz uzoraka kobasice inokulirane sa sojem *Lb. curvatus* MRS_532 nakon 7 dana proizvodnje. Oznake redaka: M=marker (1 kb, Roth); A1-3,5=izolati prikupljeni sa repeticije A; B1-5=izolati prikupljeni sa repeticije B; C1-4=izolati prikupljeni sa repeticije C; 532=soj *Lb. curvatus* MRS_532; 296=soj *Lb. sakei* MRS_296.



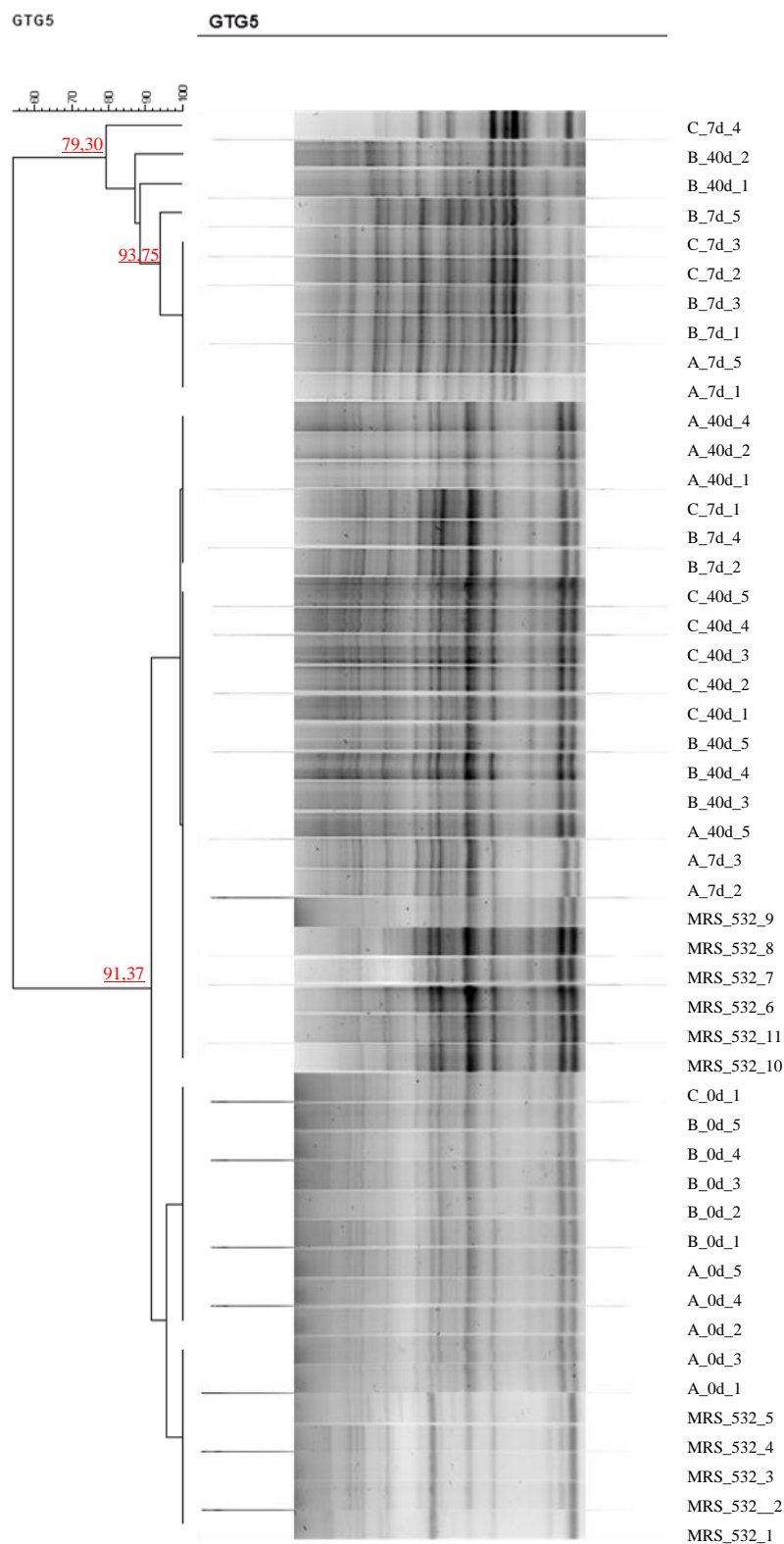
Slika 7. Rep-PCR produkti dobiveni amplifikacijom DNA izolata prikupljenih iz uzoraka kobasice inokulirane sa sojem *Lb. curvatus* MRS_532 nakon 40 dana proizvodnje. Oznake redaka: M=marker (1 kb, Roth); A1,2,4,5=izolati prikupljeni sa repeticije A; B1-5=izolati prikupljeni sa repeticije B; C1-5=izolati prikupljeni sa repeticije C; 532=soj *Lb. curvatus* MRS_532; 296=soj *Lb. sakei* MRS_296.

DNA soja *Lb. curvatus* je izolirana, amplificirana i razdvojena u horizontalnoj gel elektroforezi u 11 neovisnih repeticija. Temeljem dobivenih rep-PCR obrazaca svih 11 repeticija, kreiran je dendrogram u kojem su repeticije pokazale međusobnu sličnosti od 88,65 %, stoga su svi sojevi slični više od navedenog postotka tretirani kao isti sojevi. Dendrogram sojeva prikupljenih iz inokulirane kobasice je prikazan na Slici 8.

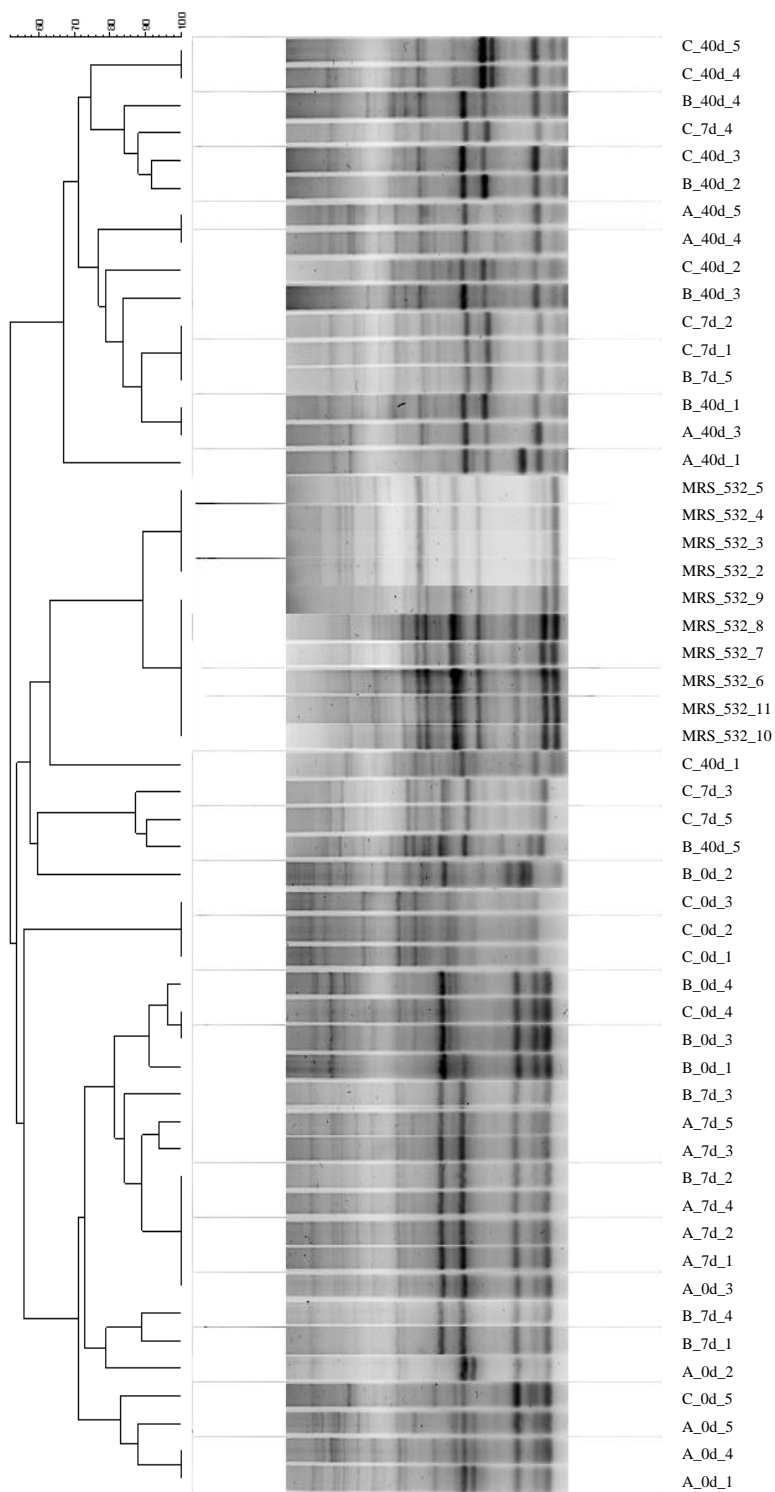
Iz dobivenog dendograma je vidljivo odvajanje na dva velika klastera. Prvi veliki klaster obuhvaća 10 sojeva koji su međusobno slični 79,30 %. U tom klasteru, prva 3 soja su različiti sojevi (manje od 88,65 % sličnosti). Preostalih 7 sojeva je međusobno slično 93,75 %, odnosno svih 7 sojeva je jednako, te su svi sojevi iz tog klastera izolirani nakon 7 dana fermentacije. U

drugom velikom klasteru grupirano je preostalih 28 sojeva sa 91,37 % sličnosti, a u taj klaster je grupiran i soj *Lb. curvatus* MRS_532, odnosno svi sojevi grupirani u ovom klasteru su jednaki kao i inokulirani starter MRS_532. Iako je inokulirani soj nakon 7 dana fermentacije izoliran u manjem broju te je detektiran soj iz klastera sa 93,75 % sličnosti, vidljivo je da inokulirani soj dominira na kraju zrenja (40 dana). Stoga se može zaključiti da je kompetitivan s prirodno prisutnom mikrobiotom i preživljava tijekom procesa proizvodnje, fermentacije i zrenja.

Dendrogram sojeva prikupljenih iz neinokulirane kontrolne kobasice je prikazan na Slici 9. Vidljivo je da su sojevi prikupljeni iz neinokulirane kobasice različiti od sojeva prikupljenih iz inokulirane kobasice, odnosno različiti su od dodanog startera.



Slika 8. Dendrogram kreiran temeljem GTG5 obrazaca amplificirane DNA izolata prikupljenih iz inokulirane kobasice, sa LamVab medija. Izolati su prikupljeni tijekom različitih faza proizvodnje, fermentacije i zrenja kobasica (0, 7 i 40 dan).



Slika 9. Dendrogram kreiran temeljem GTG5 obrazaca amplificirane DNA izolata prikupljenih iz neinokulirane kobasice, sa LamVab medija. Izolati su prikupljeni tijekom različitih faza proizvodnje, fermentacije i zrenja kobasica (0, 7 i 40 dan).

5. ZAKLJUČCI

Temeljem dobivenih rezultata može se zaključiti slijedeće:

- a. pH i aktivitet vode (a_w) gotovih inokuliranih (5,31; 0,88) i neinokuliranih kobasica (5,43; 0,87) su tipični za ovakvu vrstu proizvoda
- b. Kod kobasice inokulirane sa sojem *Lb. curvatus* MRS_532 zabilježen je značajni pad pH vrijednosti nakon 7 ($p<0,001$) i 40 dana ($p<0,05$), u odnosu na neinokuliranu kontrolu
- c. T-testom utvrđen je značajno veći ($p<0,05$) broj laktobacila detektiranih na LamVab podlozi kod inokulirane kobasice u odnosu na neinokuliranu kontrolu, tijekom svih vremenskih intervala
- d. Kod obje kobasice je broj laktobacila niži u početku (0. dan), nakon čega raste (7. dan) i stabilizira se na kraju zrenja (40. dan)
- e. Zbog povećanog broja *Enterobacteriaceae* istraživane kobasice na kraju zrenja predstavljaju svojevrsni zdravstveni rizik za konzumente
- f. Na temelju analize obrazaca metode otiska prsta (rep-PCR) je vidljivo da je dodana starter kultura *Lb. curvatus* MRS_532 kompetitivna s prirodno prisutnom mikrobiotom i preživljava procese proizvodnje, fermentacije i zrenja kobasice

6. LITERATURA

1. Andrašić, D. (1967). Lovljenje divljači. Lovački priručnik. Urednik: Dragišić, P. Lovačka knjiga, Zagreb, 565-568.
2. Andrighetto, C., Zampese L., Lombardi A. (2001). RAPD-PCR characterization of lactobacilli isolated from artisanal meat plants and traditional fermented sausages of Veneto region (Italy). Lett. Appl. Microbiol. 33, 26 – 30.
3. Bandick, N., Ring C. (1996). Game as food. Fleischwirtschaft, 76(9):888 ff.
4. Bergey, D. H. (1974). Bergey's manual of determinative bacteriology (8th ed.), Baltimore: Williams & Wilkins Co.
5. Biihne H. M., Mellett F. D., Dick L. M. T., Basson D. S. (1996). Production of Salami from Ostrich Meat with Strains of *Lactobacillus sake*, *Lactobacillus curvatus* and *Micrococcus* sp. Meat Science. Vol. 44, No. 3, 173-180.
6. Cai, Y., Pang H., Kitahara M., Ohkuma M. (2012). *Lactobacillus nasuensis* sp. nov., a lactic acid bacterium isolated from silage and emended description of the genus *Lactobacillus*. Int. J. Syst. Evol. Micr. 62:1140–1144. doi 10.1099/ijs.0.031781-0 10).
7. Caplice, E. i Fitzgerald G. F. (1999). Food fermentations: role of microorganisms in food production and preservation. Int. J. Food Microbiol., 50, 131–149.
8. Casaburi A., Di Martino V., Ferranti P., Picariello L. (2016). Technological properties and bacteriocins production by *Lactobacillus curvatus* 54M16 and its use as starter culture for fermented sausage manufacture. Food Control 59, 31-45.
9. Casaburi, A., Aristoy, M. C., Cavella, S., Di Monaco, R., Ercolini, D., Toldra, F., (2007). Biochemical and sensory characteristics of traditional fermented sausages of Vallo di Diano (Southern Italy) as affected by use of starter cultures. Meat Science, 76, 295-307.
10. Cenci-Goga, B. T., Rossitto P. V., Sechi P., Parmegiani S., Cambiotti V., Cullor J. S. (2012). Effect of selected dairy starter cultures on microbiological, chemical and sensory characteristics of swine and venison (Dama dama) nitrite-free drycured sausages. Meat Sci. 90, 599 – 606.
11. Collins, M. D., Rodrigues U. M., Ash C., Aguirre M., Farrow J. A. E., Martinez-Murcia A., Phillips B. A., Williams A. M., Wallbanks S. (1991). Phylogenetic analysis of the genus *Lactobacillus* and related lactic acid bacteria as determined by reverse

- transcriptase sequencing of 16S rRNA. FEMS Microbiol. Lett. 77:5–12. doi: 10.1111/j.1574-6968.1991.tb04313.x.
12. Comi, G., Urso, R., Iacumin, L., Rantsiou, K., Cattaneo, P., Cantoni, C., Cocolin, L. (2005). Characterisation of naturally fermented sausages produced in the North East of Italy. Meat Sci. 69, 381-392.
 13. Commission Regulation (EC) No. 1441/2007 of 5 December 2007 amending Regulation (EC) No 2073/2005 on microbiological criteria for foodstuffs (Text with EEA relevance), Official Journal of European Union.
 14. Darabuš, S., Jakelić, I. Z. (1996). Osnove lovstva. Hrvatski lovački savez, Zagreb.
 15. EFSA – Panel on Biological Hazards (2016). Risks for public health related to the presence of *Bacillus cereus* and other *Bacillus* spp. including *Bacillus thuringiensis* in foodstuffs. EFSA Journal 14, 4524.
 16. Fontana, C., Cocconcelli S. P., Vignolo G. (2005). Monitoring the bacterial population dynamics during fermentation of artisanal Argentinean sausages. Int. J. Food Microbiol. 25, 131 – 42 23).
 17. Frece, J., Kovačević D., Kazazić S., Mrvčić J., Vahčić N., Ježek D., Hruškar M., Babić I., Markov K. (2014). Comparison of sensory properties, shelf-life and microbiological safety of industrial sausages produced with autochthonous and commercial starter cultures. Food Technol. Biotechnol. 52, 307 – 316.
 18. ISO 21527 (2008). Horizontal methods for the enumeration of yeasts and moulds. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
 19. ISO 21528-2 (2004). Horizontal methods for the detection and enumeration of *Enterobacteriaceae*, colony-count method. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
 20. ISO 4832 (2006). Horizontal method for the enumeration of coliforms, colony-count technique. International Organization for Standardization, Geneva, Switzerland.
 21. Kozačinski, L., Drosinos E., Čaklovica F., Cocolin L., Gasparik J., Reichardt, S. Vesković (2008). Investigation of microbial association of traditionally fermented sausages. Food Technol. Biotechnol. 46, 93 – 106.
 22. Kozačinski, L., Zdolec, N., Hadžiosmanović, M., Cvrtila, Ž., Filipović, I., Majić, T. (2006). Microbial flora of the Croatian traditionally fermented sausage. Arch. Lebensmittelhyg. 57, 141-147.

23. Lebert, I., Leroy S., Giammarinaro P., Lebert A., Chacornac J. P., Bover – Cid S., Vidal – Carou M. C., Talon R. (2007). Diversity of microorganisms in environments and dry fermented sausages of French traditional small units. *Meat Sci.* 76, 112 – 122.
24. Lessons on Meat (1991). National Livestock and Meat Board, Chicago: Meat Board.
25. Lund, B. i Baird – Parker T. (2000). Microbiological Safety and Quality of Food. Microbial ecology of different types of food. Springer Science & Business Media.
26. Markov, K., Pleadin J., Horvat M., Bevardi M., Sokolić Mihalak D., Delaš F., Frece J. (2013). *Vet. stanica* 44, 177-186.
27. Markov, K., Pleadin J., Horvat M., Bevardi M., Sokolić Mihalak D., Delaš F., Frece J. (2013). Mikrobiološke i mikotoksikološke opasnosti za zdravstvenu ispravnost i karakterizacija domaćih kobasica od mesa divljači. *Meso*, 3, 177 - 186.
28. Marty, E., Buchs, J., Eugsten – Meier, E., Lacroix, C., Meile, L. (2012). Identification of staphylococci and dominant lactic acid bacteria in spontaneously fermented Swiss meat products using PCR – RFLP. *Food Microbiology*, 29: 157 – 166.
29. Miles J. (2004). Perfect Venison Sausage. A top of chef's favorite wild game recipe, New York.
30. Mohan, A. (2004). Basics of Sausage Making Formulation. Processing & Safety, UGA Extension Bulletin 1437.
31. Mrkonjić Fuka, M. i Kos I. (2015). Aplikacija mikrobnih kultura u cilju unaprjeđenja tehnologije proizvodnje tradicionalnih kobasica od divlje svinje. Priručnik s rezultatima VIP projekta. Agronomski fakultet Sveučilište u Zagrebu, ISBN 978-953-7878-38-2.
32. Papamanoli, E., Tzanetakis N., Litopoulou – Tzanetaki E., Kotzekidou P. (2003). Characterization of lactic acid bacteria isolated from a Greek dry – fermented sausage in respect of their technological and probiotic properties. *Meat Sci.* 2, 859 – 867. 46.
33. Peck, M. W. i Stringer S. C. (2005). The safety of pasteurised in – pack chilled meat products with respect to the foodborne botulism hazard. *Meat Sci.* 70, 461 – 475.
34. Person, A. M. i Gillet T. A. (1996). Processed Meats. New York: Chapman and Hall.
35. Pravilnik o mikrobiološkim kriterijima za hranu NN 74/08, 27.06.2008., Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja.
36. Rantsiou, K., Drosinos E. H., Urso R., Krommer J., Gasparik – Reichardt J., Tóth S., Metaxopoulos I., Comi G., Cocolin L. (2005). Molecular characterization of *Lactobacillus* species isolated from naturally fermented sausages produced in Greece. Hungary and Italy. *Food Microbiol.*, 22, 19 – 28 47.

37. Ray, B. (1992). The need for food biopreservation. In B. Ray, & M. Daeschel (Eds.). Food biopreservatives of microbial origin (pp. 1–23). Boca Raton, Florida: CRC Press.
38. Samaržija, D. (2015). Fermentirana mlijeka. Hrvatska mljekarska udruga. Udžbenici Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.
39. Švec, P., Vancanneyt M., Seman M., Snauwaert C., Lefebvre K., Sedláček I., Swings (2005). Evaluation of (GTG)5-PCR for identification of *Enterococcus* spp. FEMS. Microbiol. Lett. 1, 59-63.
40. Trichopoulou, A., Soukara S., Vasilopoulou E. (2007). Traditional foods: A science and society perspective Trends. Food Sci.Technol. 18, 498 – 504.
41. Työppönen, S., Markkula A., Petäjä E., Suihko M. L., Mattila – Sandholm T. (2003). Survival of *Listeria monocytogenes* in North European type dry sausages fermented by bioprotective meat starter cultures. Food Control 14, 181 – 185.
42. Vandamme, P., Pot B., Gillis M., De Vos P., Kersters K., Swings J. (1996). Polyphasic taxonomy, a consensus approach to bacterial systematics. Microbiol. Rev 60:407–438.
43. Vignolo, G., Fontana, C., Fadda, S. (2010). Semidry and dry fermented sausages. In F. Toldrá (Ed.). Handbook of Meat Processing (pp. 379-398), Oxford: Wiley-Blackwell.
44. Villani, F., Casaburi, A., Pennacchia, C., Filosa, L., Russo, F., Ercolini, D. (2007). The microbial ecology of the Soppressata of Vallodi Diano, a traditional dry fermented sausage from Southern Italy, and in vitro and in situ selection of antiochthonous starter cultures. Applied and Environmental Microbiology. 73, 5453-5463.
45. Vodič za mikrobiološke kriterije za hranu (3. izmijenjeno izdanje), ožujak, 2011., Ministarstvo poljoprivrede, ribarstva i ruralnog razvoja.
46. Wood, B. J. B. (1997). Microbiology of fermented foods, London: Blackie Academic & Professional.
47. Wood, B. J. B. i Holzapfel W. H. (1995). The genera of lactic acid bacteria, London: Blackie Academic & Professional. 53, 115 – 125.
48. Živković, J. (1982). Higijena i tehnologija mesa, I. dio. Veterinarski fakultet Sveučilišta u Zagrebu, Zagreb.

URL izvori:

1. German Society for Hygiene and Microbiology (DGHM). Reference and warning values for raw sausages and raw cured products at retail level (2004).
<http://www.dghm-richt-warnwerte.de> (Datum pristupa: 28. 07. 2017.)
2. Microbial Guidelines for Ready-to-Eat Foods, Health Canada, 2010.
http://publications.gc.ca/collections/collection_2014/sc-hc/H164-167-2013-eng.pdf
(Datum pristupa: 16.08.2017.)
3. Hartemink R., Domenech V. R., Rombouts F. M. (1997). LAMVAB—A new selective medium for the isolation of lactobacilli from faeces. *Journal of Microbiological Methods*. Volume 29, Issue 2, Pages 77-84.
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701297000250>
(Datum pristupa: 24. 07. 2017.)
4. Wizard® Genomic DNA Purification Kit, Instructions For Use Of Products A1120, A1123, A1125 And A1620.
<https://worldwide.promega.com/-/media/files/resources/protcards/wizard-genomic-dna-purification-kit-quick-protocol.pdf> (Datum pristupanja: 07.08.2017.)
5. Domig K., Kiss H., Petricevic L., Viernstein H., Unger F., Kneifel W. (2014). Strategies for the evaluation and selection of potential vaginal probiotics from human sources: an exemplary study. *Benef Microbes*. 5(3):263-72. doi: 10.3920/BM2013.0069.
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24675230> (Datum pristupa: 20.06.2017.)
6. List of procariotypic names with standing in nomenclature (LPSN):
<http://www.bacterio.cict.fr> (Datum pristupa: 06.07.2017.)

7. ŽIVOTOPIS

Moje ime je Petra Špoljarić i rođena sam 3. lipnja 1993. godine u Varaždinu. Rano djetinjstvo, točnije prvih pet godina života provela sam živeći s obitelji u Svetom Đurđu, a nakon toga preselili smo se u Selnik, malo mjesto pokraj Ludbrega, gdje živim i dan danas na adresi Stjepana Radića 14.

Osnovnoškolsko obrazovanje stekla sam u Ludbregu, a srednjoškolsko farmaceutsko zvanje u Medicinskoj školi Varaždin. Sve te godine školovanja postizala sam odlične rezultate popraćene brojnim priznanjima, a svakako meni najdraže je priznanje i nagrada Medicinske škole za učenicu generacije. Usprkos zavidno stečenom znanju s područja farmacije, kojeg nudi moja srednja škola, ne upisujem se na dugo željeni Farmaceutski fakultet u Zagrebu koji je bio moj prvi izbor. Moj drugi izbor u odabiru fakulteta bio je Agronomski fakultet kojeg i upisujem 2012. godine. 2015. godine u redovnom roku završavam preddiplomski studij Biljne znanosti te stječem titulu prvostupnika agronomije. Trenutno pišem diplomski rad kojim ću privesti kraju diplomski studij, Agroekologija: Mikrobna biotehnologija u poljoprivredi te po završetku steći zvanje magistre agronomije. Kroz svih pet godine redovnog studiranja, kontinuiranog i marljivog učenja postigla sam odlične rezultate, te se svrstavam u kategoriju najboljih studenata odabranog smjera, a usudila bi se reći i generacije sa prosjekom 5,00 na diplomskom studiju i dobivenom Rektorovom nagradom za znanstveni rad iz područja mikrobiologije.

Pozitivnim stavom, protkanim optimizmom, 2012. godine započinjem sa osnivanjem plantaže kupina, malina i lješnjaka uz potporu obitelji, kako bi svoje znanje i vještine mogla praktično primijeniti. Razmišljajući o svojem životu u proteklih pet godina i svemu što je u njemu drugačije i neočekivano od onog što sam planirala kao maturantica, shvaćam da je život nepredvidiv, ali zahvalan prema ljudima koji se trude. Agronomski fakultet možda nije bio moj prvi izbor pri odabiru fakulteta, ali omogućio mi je velike promjene u životu i danas sam iznimno zadovoljna i ponosna odabranim fakultetom. Marljivo radim i radujem se novostečenim znanjima koja će još više unaprijediti mene kao osobu.